

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平10-500889

(43)公表日 平成10年(1998)1月27日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	
B 0 1 J 13/06		9441-4D	B 0 1 J 13/02	E
A 6 1 J 3/07		7720-4C	A 6 1 J 3/07	M
A 6 1 K 9/50		7329-4C	A 6 1 K 9/50	C
31/405		9454-4C	31/405	
31/455		9454-4C	31/455	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-527151
(86) (22)出願日	平成7年(1995)4月17日
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)10月15日
(86)国際出願番号	PCT/US95/04711
(87)国際公開番号	WO95/28227
(87)国際公開日	平成7年(1995)10月26日
(31)優先権主張番号	08/228, 481
(32)優先日	1994年4月15日
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	08/229, 283
(32)優先日	1994年4月18日
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	テンブル・ユニバーシティ アメリカ合衆国ペンシルバニア州19122, フィラデルフィア, ノース・ブロード・ストリート(番地なし)
(71)出願人	チルドレンズ・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア アメリカ合衆国ペンシルバニア州19104, フィラデルフィア, サーティフォース・アンド・シビック・センター・ブルバード (番地なし)
(74)代理人	弁理士 湯浅 森三 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 水性溶媒封入法、装置およびマイクロカプセル

(57)【要約】

選択された水溶性陰イオンポリマーまたはその塩と選択された水溶性アミンまたはその塩との反応生成物であるカプセル壁に囲まれた水性コアからなる、実質的に非水性夾雜物を含まないマイクロカプセルであって、該選択された陰イオン性ポリマーおよびアミンは、該ポリマーの水溶液の液滴を選択されたアミンの水溶液中へ導入されたとき、陰イオン性ポリマーのアミン塩の安定なマイクロカプセルが生じるような性質のものである。マイクロカプセルの水性コアは、ロタウイルスのような免疫原性物質を含めて、種々の活性成分のいずれのものを含んでもよい。活性な剤を含むマイクロカプセルを含めて、マイクロカプセルを製造するための本発明の方法および装置、並びにその使用方法も開示される。

## 【特許請求の範囲】

1. カプセル壁に囲まれた水性コアを含むマイクロカプセルであつて、前記マイクロカプセルが非-水性汚染物質を実質的に含まず、前記カプセル壁が選択された水溶性陰イオンポリマーもしくはその水溶性塩と選択された水溶性アミンまたはその水溶性塩との反応生成物からなり、前記陰イオンポリマーおよび前記アミンは、対となるポリマーの水溶液の小滴が対となるアミンの水溶液へ導入された時に陰イオンポリマーのアミン塩の安定したマイクロカプセルが形成されるような特性を有する一対の陰イオンポリマーとアミンから選択されるものである前記マイクロカプセル。
2. 陰イオンポリマーが反応性カルボキシレートまたはスルフェート基を有し、アルギン酸、発蛍光团と結合したアルギン酸、アラビン酸、セルローススルフェート、カルボキシメチルセルロース、カラジーナン、コンドロイチンスルフェート、ヘパリン、ポリアクリル酸、ポリオキシエチレン架橋ポリアクリル酸およびポリビニルカルボン酸からなる群から選択される請求項1のマイクロカプセル。
3. 発蛍光团が、フルオレセインイソチオシアネートおよびローダミンイソチオシアネートから選択される請求項2のマイクロカプセル。
4. 塩基が、アルギニン、デシルアミン、ドデシルアミン、エチレンジアミン、ピペラジン、メチレンブルー、オクタデシルアミン、トリエチルアミン、トリエチレンテトラミンおよびスペルミンからなる群から選択されるモノ-、ジ-、トリ-またはテトラ-アミノ化合物である請求項1のマイクロカプセル。
5. 陰イオンポリマーが、ポリアクリル酸、ポリビニルカルボン酸、アルギン酸、ポリオキシエチレン架橋ポリアクリル酸、セルローススルフェート、カルボキシメチルセルロース、ヘパリンおよびコンドロイチンスルフェートから選択され、そしてアミンがスペルミン、デシルアミン、ドデシルアミン、テトラデシルアミン、メチレンブルー、ヘキサデシルアミンおよびオクタデシルアミンから選択される請求項1のマイクロカプセル。
6. 陰イオンポリマーが、ポリアクリル酸、ポリビニルカルボン酸およびセルローススルフェートから選択され、そしてアミンがエチレンジアミンおよびトリエチレンテトラミンから選択される請求項1のマイクロカプセル。

7. 陰イオンポリマーが、ポリビニルカルボン酸、ポリアクリル酸またはアルギン酸であり、アミンがトリエチルアミン、アルギニンまたはピペラジンである請求項1のマイクロカプセル。

8. 陰イオンポリマーがアラビン酸であり、アミンがデシルアミン、ドデシルアミン、テトラデシルアミン、メチレンブルー、ヘキサデシルアミンおよびオクタデシルアミンから選択される請求項1のマイクロカプセル。

9. 前記マイクロカプセルが非-水性汚染物質を実質的に含まず、カプセル壁が以下の反応生成物：

a) メチレンブルーまたはその水溶性塩とセルローススルフェートまたはその水溶性塩；

b) メチレンブルーまたはその水溶性塩とセルロースアセートフタレートまたはその水溶性塩；

c) スペルミンまたはその水溶性塩とアルギン酸またはその水溶性塩；

d) スペルミンまたはその水溶性塩とセルローススルフェートまたはその水溶性塩；

e) スペルミンまたはその水溶性塩とコンドロイチンスルフェートまたはその水溶性塩；

f) トリエチレンテトラアミンまたはその水溶性塩とアルギン酸またはその水溶性塩；

g) トリエチレンテトラアミンまたはその水溶性塩とセルローススルフェートまたはその水溶性塩；

h) オクタデシルアミンまたはその水溶性塩とアルギン酸またはその水溶性塩；

i) オクタデシルアミンまたはその水溶性塩とセルローススルフェートまたはその水溶性塩；

j) オクタデシルアミンまたはその水溶性塩とカルボキシメチルセルロースまたはその水溶性塩；

k) オクタデシルアミンまたはその水溶性塩とセルロースアセートフタレートまたはその水溶性塩；

- 1) オクタデシルアミンまたはその水溶性塩とポリアクリル酸またはその水溶性塩；または
  - 2) オクタデシルアミンまたはその水溶性塩とカルボポール(Carbopol) 934® またはその水溶性塩；  
を含む前記カプセル壁に囲まれた水性コアを含む請求項1のマイクロカプセル。
10. 前記カプセル壁がスペルミンまたはその水溶性塩とアルギン酸またはその水溶性塩との反応生成物である請求項9のマイクロカプセル。
11. 前記カプセル壁がスペルミンまたはその水溶性塩とコンドロイチンスルフエートまたはその水溶性塩との反応生成物である請求項9のマイクロカプセル。
12. 陰イオンポリマーが平均分子量10 kD以上である請求項1-10のいずれか1のマイクロカプセル。
13. 0.1-2,000  $\mu$  の範囲の粒子径を有する請求項1-10のいずれか1のマイクロカプセル。
14. 前記水性コアに有効成分を含む請求項1-10のいずれか1のマイクロカプセル。
15. 前記有効成分が、天然産生およびバイオテクノロジー技術により誘導されるたんぱく質性物質；天然産生およびバイオテクノロジー技術により誘導される非-たんぱく質性巨大分子；細胞；薬物および抗生物質；ならびに染料および顔料からなる群から選択される請求項14のマイクロカプセル。
16. 前記たんぱく質性物質がグルコース6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、カルシトニン、エリスロポイエチン、ヘモグロビン、インシュリン、インターロイキン、ソマトトロピン、およびバチルス スリギエンシス(*Bacillus thuringiensis*)の殺幼虫性たんぱく質から選択される請求項15のマイクロカプセル。
17. 前記非-たんぱく質性巨大分子がヘパリンである請求項15のマイクロカプセル。
18. 前記細胞がヒトまたは他の種からの膵臓ランゲルハンス島細胞、肝細胞およびインターロイキン-および他の免疫調節因子-分泌細胞から選択される請求項15のマイクロカプセル。
19. 前記薬物および抗生物質がフルオロウラシル、プレドニゾロン、インドメサ

シン、テトラサイクリン、テオフィリンおよびニコチンアミドから選択される請

求項15のマイクロカプセル。

20. 前記染料および顔料がブルーデキストラン、フェノールレッドおよび活性炭から選択される請求項15のマイクロカプセル。

21. 前記有効成分が免疫原性物質である請求項14のマイクロカプセル。

22. 前記免疫原性物質が、たんぱく質、ペプチド、ウィルス粒子、原核生物、原生動物および多細胞寄生生物からなる群から選択される少なくとも一つの構成員である請求項21のマイクロカプセル。

23. 前記有効成分がロタウィルスである請求項14のマイクロカプセル。

24. 前記ロタウィルスが以下のもの：ウシ WC3 (ATCC 受託番号 VR-2102)；HCR3a (ATCC 受託番号 VR-2325)；ヒト vp4 W179 で修飾されたウシ WC3；ヒト W178-8 で修飾されたウシ WC3；ヒト W179-9 で修飾されたウシ WC3、(ATCC 受託番号 VR-2194 および VR-2196) または SC2-9 (ATCC 受託番号 VR-2417)；ヒト W179-4, 9 で修飾されたウシ WC3 (ATCC 受託番号 VR-2415) および W179-4 で修飾されたもの (ATCC 受託番号 VR-2377)；ヒト vp4 DS1 で修飾されたウシ WC3 (ATCC 受託番号 VR-2416)；ヒトブリコウト (Bricout) B-9 で修飾されたウシ WC3；ヒト vp4 ブリコウト A で修飾されたウシ WC3；ヒト W179-9 で修飾された HCR3a (ATCC 受託番号 VR-2324)；アカゲザルロタウィルス RRV；ヒト Wa-9 で修飾された RRV；ヒト DS1-9 で修飾された RRV；ヒト P-9 で修飾された RRV；およびヒト ST3-9 で修飾された RRV から選択される請求項23のマイクロカプセル。

25. 500-1,000  $\mu$  の範囲の粒子径を有する請求項14のマイクロカプセル。

26. 1-10  $\mu$  の範囲の粒子径を有する請求項14のマイクロカプセル。

27. 凍結乾燥形である請求項14のマイクロカプセル。

28. 腸溶性皮膜を有する請求項14のマイクロカプセル。

29. 前記腸溶性皮膜がセルロースアセテートフタレートおよびポリオキシエチレン架橋ポリメタアクリル酸から選択される物質からなる請求項28のマイクロカプセル。

30. 次の工程：

a) 選択した陰イオンポリマーまたはその塩を水に溶かして陰イオンポリマー溶液を作り；

b) 選択したアミンまたはその塩を水に溶かしてアミン溶液を作り；

c) 陰イオンポリマー溶液をアミン溶液へ小滴状でまたは中断される細い流れで添加し；

d) マイクロカプセルを得る

からなる請求項1の水性コアのマイクロカプセルの製造方法。

31. 前記陰イオンポリマー溶液が少なくとも2.5センチボアズの粘度を有する請求項30の方法。

32. 工程c)を行う前に工程a)の陰イオンポリマー溶液に有効成分を溶解または懸濁させる工程をさらに含む請求項30の方法。

33. 陰イオンポリマー溶液が添加されるアミン溶液の少なくとも一部が動いている請求項30の方法。

34. 陰イオンポリマー溶液を前記アミン溶液へ加える時に前記ポリマー溶液へ超音波刺激を加える請求項30の方法。

35. 前記ポリマー溶液を前記アミン溶液へ添加する直前に前記ポリマー溶液の細く流れる流れを機械的に中断することにより殆ど均一な径のポリマー溶液の小滴を作ることからなる請求項30の方法。

36. 前記ポリマー溶液の細い流れを超音波刺激により中断することからなる請求項35の方法。

37. 以下の工程：

a) 水溶性陰イオンポリマーまたはその水溶性塩および水溶性アミンまたはその水溶性塩を選択し、前記陰イオンポリマーおよび前記アミンは対となるポリマーの水溶液の小滴を対となるアミンの水溶液へ入れた時に陰イオンポリマーのアミン塩の安定したマイクロカプセルが形成されるような特性を有する一対の陰イオンポリマーとアミンから選択され；

b) 前記選択した陰イオンポリマーまたはその塩を水に溶かして少なくとも2.5センチボアズの粘度を有する陰イオンポリマー溶液を作り；

- c) 前記選択したアミンまたはその塩を水に溶かしてアミン溶液を作り；
- d) 前記陰イオンポリマー溶液の小滴を作り；
- e) 陰イオンポリマー溶液の前記小滴を前記アミン溶液へ添加し；
  
- f) 前記小滴および前記アミン溶液を互いの界面で殆ど即座に反応させて前記選択した酸および選択した塩基の塩のフィルムを含むマイクロカプセルを作るからなる少なくとも一つのマイクロカプセルの製造方法。

38. さらに次の工程：

- a) 前記陰イオンポリマー溶液の連続する小滴の接触を、前記連続する小滴の各々に関して前記工程 f)が実質的に終了するまで避けるような方法で前記工程 d)- (f)を迅速な順番で繰り返し実施し、
- b) 前記マイクロカプセルを集め

を含む複数のマイクロカプセルを作る請求項35の方法。

39. 前記工程 d)を、前記陰イオンポリマー溶液の下に向かって流れる流れへ脈動するエネルギーを施すことにより実施する請求項38の方法。

40. 前記脈動するエネルギーが音波信号の使用によりもたらされ、その際前記得られたマイクロカプセルが均一な粒子径である請求項39の方法。

41. 前記工程 d)が前記陰イオンポリマー溶液の細かいスプレーを形成することにより実施される請求項38の方法。

42. さらに工程 d)を実施する前に、工程 b)の陰イオンポリマー溶液中に有効成分を溶解または懸濁する工程を含む請求項37の方法。

43. さらに、工程 d)を実施する前に、工程 b)の陰イオンポリマー溶液中に有効成分を溶解または懸濁する工程を含む請求項38の方法。

44. 請求項1のマイクロカプセルを製造するための装置において、前記マイクロカプセルが均一径であり、前記装置は選択した陰イオンポリマー溶液の小滴を選択したアミン溶液の流れへ導入するために適合するようにしたものであって、該装置が次のもの：

管状部材であって、該記部材は前記アミン溶液のための側肢入口セグメントおよび交差する垂直セグメントを含み、該垂直セグメントは前記側肢セグメント

と連結する側入口および陰イオンポリマー溶液を受ける上面開口部を有し、底部を有しそしてアミン溶液がその中を流れる時に前記垂直セグメントへ陰イオンポリマー溶液の小滴を導入するための前記垂直セグメントの上部に位置する毛管部材であって、前記毛管部材の前記底部は前記垂直セグメントの上面開口

部の上に予め決めた距離で固定されている

からなる上記の装置。

45. さらに、前記毛管部材の前記底部にまたは底部近くに前記毛管部材に接する音響プローブを有する請求項44の装置。

46. 以下のもの：

上部管および下部管であって、前記管は垂直に配置されそして直列状であり、前記管の両方とも上端部および下端部およびその中で反応が生じる小滴の予め選択した最大寸法の桁の直径を有するもの、

前記上部管の下端部付近へ脈動する機械的エネルギーを付与する手段；

前記上部管を通り下向きに流れる第一の反応溶液の流れを起こさせる手段；

前記機械的エネルギーの頻度および強度、前記第一の反応溶液の流体力学的特性および前記上部管の下端部の表面特性は、前記脈動するエネルギーに相当する頻度および前記管の直径に相当する寸法を有する離れた小滴の列として前記上部管を出すために前記第一の反応溶液の流れを起こさせるために一まとめに選択され；

第二の反応溶液の流れを下向きでない方向から前記管の下部へ入れ次いでその中で下向きに流れさせる手段；

上部管の下端部から下向きに滴下する前記第一の反応溶液の小滴がその上端部で前記下部管へ入りそして前記第二の反応溶液の流れが下向きでない方向から下向きに向かう地点で前記第二の反応溶液の流れと接触するような空間的関係を有する前記上部管および下部管

からなる二つの反応物間の滴下反応を提供する装置。

47. 請求項21の複数のマイクロカプセルを含むワクチン。

48. 前記マイクロカプセルの免疫原性物質がロタウィルスである請求項47のワク

チ ン。

49. 前記マイクロカプセルの免疫原性物質が肝炎B表面抗原である請求項47のワクチン。

50. 前記マイクロカプセルの免疫原性物質が生きた弱毒化ウィルスである請求項47のワクチン。

51. 500 - 1,000  $\mu$  の範囲の粒子径を有する請求項13のマイクロカプセル。

52. 1 - 10  $\mu$  の範囲の粒子径を有する請求項13のマイクロカプセル。

## 【発明の詳細な説明】

## 水性溶媒封入法、装置およびマイクロカプセル

関連出願のクロス・リファレンス

本出願は、以下の同時係属特許出願：1994年4月15日出願の米国特許出願第08/228,481号明細書；1994年4月18日出願の米国特許出願第08/229,283号明細書；および1994年4月18日出願の米国特許出願第08/229,520号明細書の一部継続出願である。前述の特許出願の開示はそのまま本明細書中に援用される。

発明の分野

本発明は、種々の活性物質を含むことができる水性または実質的に水性のコアを封入した異方性塩膜を有する新規のマイクロカプセルに関する。該マイクロカプセルは、水性媒質中におけるルイス酸および塩基壁生成反応体の界面反応によって製造される。

発明の背景

マイクロカプセル封入は、比較的薄いコーティングを固体小粒子または液体小滴の分散系に対して適用し、それによって液体を固体に変換し、コロイド性および表面特性を変更し、環境保護を提供し、そして被覆された物質の放出性または利用可能性を調節するための手段を提供することができる処理である。これらの特性のいくつかはマクロ包装技術によって達成されうるが、しかしながら、マイクロカプセル封入の独自性は、被覆粒子の小ささおよびそれらの引き続きの使用並びに広範囲の剤形および製品用途に対するそれらの適合である。従来、マイクロカプセルを工業規模で製造する既知の実行可能な方法は、しばしば、有機溶媒の使用を必要としてきた。しかしながら、有機溶媒の使用は環境上のおよび安全性の問題を与えることがある。更に、マイクロカプセルから有機溶媒を全て除去することはしばしば困難であり、したがって有機混入物が残る。

ワクチンを供給する手段としてマイクロカプセルを用いることが提案されてきた。二つの広範な種類の抗原デリバリーシステム、すなわち、固体（すなわち多孔質）マイクロカプセルおよび物理的に異なる壁によって取り囲まれたコア部分

を含むマイクロカプセルは、免疫を促進するそれらの能力について研究されてきた。固体マイクロカプセルは、コロイドのコアセルベーション（クウォク（K w o k），K. K. ら、1991年，Pharm. Res.，8：341～344）、物理的手段（例えば、相分離）若しくは化学薬剤（例えば、酸塩化物）によるタンパク質の沈降（レヴィ（Levy），M. C. ら、1991年，J. Pharm. Sci.，80：578～585）、またはポリエステル皮膜によって水性分散系を取り囲む溶媒蒸発技術（シンハ（Singh），M. ら、1991年，Pharm. Res.，8：958～961）を含めた様々な処理によって製造することができる。抗原デリバリーに有用なことが分かった壁／コアシステムとしては、リボソーム（ゲリア（Gerlier），D. ら、1983年，J. Immunol.，131：490）、イスコムス（ISCOMS）（クラーセン（Claassen），I. およびオスターhaus（Osterhaus），A. 、1992年，Res. Immunol.，143：531～541）およびプロテオソーム（グールド・フォグライト（Gould-Fogerite），S. およびマニノ（Mannino），R. 、1992年，Liposome Technology，第3版，グレゴリアディス（Gregoriadis），G.（監修），CRC Press（Press），ボカ・ラション，FL；ミラー（Miller），M. D. ら、1992年，J. Exp. Med.，176：1739～1744）がある。

おそらく、抗原デリバリーシステムの中で研究された最良のものは、乳酸およびグリコール酸の直鎖状ポリマー（すなわち、ポリ（DL-ラクチドコグリコリド））（PLCG）に由来するものである（エデルマン（Edelman），R. ら、1993年，Vaccine，11：155～158；エルドリッジ（Eldridge），J. H. ら、1989年，Curr. Top. Microbiol. Immunol.，146：59～66；エルドリッジ，J. H. ら、1990年，J. Controlled Release，11：205～214；エルドリッジ，J. H. ら、1989年，Adv. Exp. Med. Biol.，251：191～202；エルドリッジ，J. H. ら、1991年，

Mol. Immunol., 28: 287~294; エルドリッジ, J. H. ら  
 、1991年, Infect. Immun., 59: 2978~2986; マー  
 クス (Marx), P. A. ら、1993年, Science, 260: 132  
 3~1327; モルドビース (Moldoveanu), Z. ら、1993年,  
J. Infect. Dis., 167: 84~90; オーハガン (O'Hagan), D.  
 T. ら、1991年, Immunology, 73: 239~242; レイ (Ray), R. ら、1993年, J. Infect. Dis., 167: 752~  
 755; レイド (Reid), R. ら、1993年, J. Immunol., 150: 323A; レイド, R. H. ら、1993年, Vaccine, 11: 1  
 59~167)。抗原性物質のPLCGマイクロカプセル中への封入は多数の利  
 点を与える。第一に、マイクロカプセルは加水分解によって容易に分解されて乳  
 酸およびグリコール酸を生成する。第二に、5 μm未満の大きさのPLCGマイ  
 クロカプセルは、マウスの経口接種後に、バイアード斑、腸間膜リンパ節および脾  
 臓に容易に浸透する。第三に、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウ  
 イルス、シミアン免疫不全ウイルス、黄色ブドウ球菌 (Staph. aureus) エンテロトキシンBトキソイドおよび卵アルブミンを含めたPLCGマイク  
 ロカプセル封入抗原を用いるマウスの経口、腹腔内、鼻腔内または皮下接種は、  
 ウィルスまたはタンパク質不含の同一用量を接種された動物において引き起こさ  
 れるよりも大きい免疫応答を引き起こす。更に、不活化ウイルスを用いるマウス  
 の経口接種は、粘膜表面上での増大した抗原特異的IgA応答を引き起こす。最  
 後に、PLCGマイクロカプセルは、成人被験者に対して副作用を伴うことなく  
 経口投与してきた。

PLCGマイクロカプセルの主な欠点は、有機溶媒の不可欠の使用である。有  
 機溶媒との接触は、ウィルスおよび細菌病原体の感染力を不活性化する傾向があ  
 り、そして更に、体液性または細胞性免疫応答の誘導に臨界的な表面タンパク質  
 の免疫原性を変更することがある。実際に、PLCGマイクロカプセルによって  
 抗原特異的免疫応答を引き起こすには、多量のウイルスタンパク質が必要とされ  
 てきた。

米国特許第3,137,631号明細書は、加熱若しくは触媒適用または両方による架橋合成樹脂による水不溶性有機液体の封入に関する。カプセルシェルは、共有結合した非イオン材料からまたは熱変性性タンパク質から成形されると記載されている。結果として得られたカプセルは、架橋剤による第二の処理から利点を得て、カプセルに対して増加した安定性を与える。

米国特許第4,205,060号明細書は、ポリマー性イオン樹脂と薬剤との反応によって生成される、酸性ポリマーと塩基性薬剤との反応によってかまたは逆に、塩基性ポリマーと酸性薬剤との反応によって生成される水溶性塩を含むコアを含むマイクロカプセルを開示している。マイクロカプセルの壁は、水不溶性皮膜生成用ポリマーから生成される。適当な外装剤として定義される水不溶性皮膜生成用ポリマーは全て、中性非イオン化ポリマーである。その発明のカプセルは、薬剤およびコアポリマーを反応させることによって生成された塩の水溶液を製造し；水不溶性外装生成用ポリマーの第一水不混和性有機液体中溶液を製造し；該水溶液を該有機溶液中に分散させ；そして外装生成用ポリマーにとって非溶媒である第二水不混和性液体に対して該分散液を加えて、分散水性相の小滴のまわりに皮膜を沈降させることによって製造される。

米国特許第4,606,940号明細書は、封入材料を沈降させるコアセルベーションによるマイクロカプセルの製造を開示している。単コロイドを水中に分散させ、そして水に対する親和性がコロイドよりも大きい化合物を加えることによってコロイドの周辺から溶媒和の水を除去する。これは、コロイド鎖を互いにより接近させ且つコアセルベートを生成させる。温度変化は、コアセルベーションによる封入を促進するのに必要である。

米国特許第3,959,457号明細書は、(a) 有機多官能性ルイス塩基の(b) 低沸点極性有機溶媒中水不混和性溶液および(c) 部分親水性で部分親油性の多官能性ルイス酸の水溶液の微細分散エマルジョン中で生成された反応生成物を含んで成るマイクロカプセルを開示している。その発明のカプセルは、親油性コアを有する。

米国特許第5,132,117号明細書は、カプセル状の異方性ルイス塩膜によって取り囲まれた水性または実質的に水性のコアから成るマイクロカプセルを

開示している。これらの水性コアマイクロカプセルは、適當なルイス酸壁生成用反応体およびコア材料の水溶液を適當な非水性溶媒中に分散させ、適當なルイス塩基壁生成用反応体を含む追加の量の非水性溶媒を加え、そして界面反応によって生成されたマイクロカプセルを集めることによって製造される。或いは、その特許の水性コアマイクロカプセルは、適當なルイス酸壁生成用反応体およびコア材料の水溶液を、適當なルイス塩基壁生成用反応体を含む適當な非水性溶媒中に分散させ、そして界面反応によって生成されたマイクロカプセルを集めることによって製造してよい。

F. リム (L i m) は、ベルギー王国特許第882,476号明細書(1980)において、アルギン酸カルシウム微小球を最初に生成した後、それらを表面処理してポリアルギン酸リシンまたはポリアルギン酸エチレンイミンコアセルベートに変換し、そして最後に、カルシウムキレート剤による処理によってコアを液化する方法を記載している。

ラー (R h a) およびロドリクス・サンチエス (R o d r i q u e s - S a n c h e z) は、米国特許第4,744,933号明細書(1988)において、一方の電荷のポリマーを反対電荷のポリマーに対して直接的に噴霧することによってリムの手順を簡単にして、リムのものと同様の複合コアセルベートを生成している。

ドーツエンバーグ (D a u t z e n b e r g) らは、英國特許出願第2135954A号明細書(1984)において、同様に、陰イオンポリマー溶液の2~3mm小滴を数10センチメートル落下させて反対電荷のポリ第四アンモニウム塩溶液中に押し込むことによる複合コアセルベートマイクロカプセルの生成を記載している。これらの他の方法のいずれにおいても、マイクロカプセルを有效地に製造するのに高粘度ポリマー溶液が必要とされることは明らかであり、いずれも、2種類の反対電荷のポリマーを用いて複合コアセルベートを生成する。

イトー (I t o) ら、S c i e n c e, 263: 66~68 (1994) は、経時共焦点レーザー顕微鏡写真を用いて、マイクロ範囲の比較的高いポリマー濃度およびポリマー不含による他の範囲の発生によって、ポリアクリル酸ナトリウムなどの陰イオンポリマーのコロイド溶液が不均一に向かう傾向を実証した。

本発明は、米国特許第3,959,457号明細書および同第5,132,117号明細書に関する上記のものと類似しているが、全ての水性系を用いるという点で異なるマイクロカプセル封入技術を提供する。本発明のマイクロカプセルは、多陰イオン高分子の十分に可溶性でない（アミン）塩の生成に基いている。この処理は、極めて穏やかな条件下において一様な大きさの粒子を生じができる。

対照的に、既知の完全な水性系の多くは、単純コアセルベートまたは複合コアセルベートの生成に基き、広範囲の粒度のミクロビーズを提供する。B. R. マシューズ（Matthews）およびJ. R. ニクソン（Nixon）、走査型電子顕微鏡によるゼラチンマイクロカプセルの表面特性、J. Pharm. Pharmacol. 26: 383~384 (1974)。若干の単純コアセルベートは、タンパク質性コアセルベートを沈降させるのに強酸性（例えば、pH 3~4）媒質を必要とする欠点を持っている。水溶液から沈降した複合コアセルベートは、少なくとも2種類の反対電荷のポリマーを必要とする。ヒドロキシエチルアクリレートに基くヒドロゲルの製造のための完全な水性系は、ペルオキシ種または電離線によって触媒された遊離基重合を伴う。J. D. アンドレード（Andrade）、D. ゴフ（Gough）、B. コルフ（Koff）、W. J. クニトモ（Kunitomo）およびR. V. ウェイジノン（Wagenson）、直接輸血用被覆吸着剤：HEMA活性炭、Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs 17: 222~228 (1971)。このような触媒は、不安定なタンパク質分子または自然のままの生物に有害であるらしい。水性アルギン酸およびカルシウムイオンから製造されたヒドロゲルは、微生物および多細胞生物（例えば、線虫）両方を最後の放出のために埋め込み且つ生きたまま保存するのに十分に穏やかな処理で製造することができる。F. リムおよびA. M. サン（Sun）、Science 20: 908~910 (1980)。更に、アルギン酸カルシウム系はその1種類のアルギン酸塩に限定されるらしく、本発明のアミン塩を提供することはないと考えられる。

多数の最近の論文は、免疫原性材料を封入するが非水性系に頼る他の手段を記載している。J. H. エルドリッジら (1991)、Molecular Im-

m u n o l o g y 上記、R. エデルマンら (1993)、V a c c i n e 上記、並びに R. レディ (R e d d y) 、S. ネア (N a i r) 、K. バーンスタッド (B y r n e s t a d) および B. T. ルース (R o u s e) 、ウイルス性免疫の抗原デリバリーシステムとしてのリポソーム、S e m . I m m u n o l . 4 : 91 ~ 96 (1992)。免疫原性サブユニットワクチン成分は、ジクロロメタンまたはクロロホルムなどの揮発性有機溶媒を用いる処理によってポリアクリレートおよびポリグリコリド／ラクチドビーズまたはリポソーム様小胞中に捕獲されてきた。溶媒は、ポリマー溶液のエマルジョンまたは乾燥脂質皮膜を生成するのに用いられる。ポリアクリレートおよびポリグリコリド／ラクチド処理は、典型的に、本発明のまだ最適化されていない処理で見られる比較的高い(約5%)効率と比較して、極めて低い(約0.01%)免疫原または抗原捕獲効率によってミクロビーズを生じる。

したがって、活性物質、特に、免疫原性物質のマイクロカプセル封入に有効なシステムに対する要求はまだ存在している。

#### 発明の概要

一つの態様により、本発明は、水性コアを有し且つ非水性混入物を実質的に含まない安定なマイクロカプセルを提供する。該マイクロカプセルは、好都合に、活性物質を含むことができる。更に、本発明は、このようなマイクロカプセルを製造する高性能の方法を提供する。

本発明は、更に、試薬の完全な水性系を室温またはそれ未満において高圧を必要とすることなく用いて材料を封入する手段を提供する。それゆえ、大部分の封入システムにおいて従来用いられた有機溶媒、高温および／または高圧に対して不安定である多数の物質または材料に対して用いられる。このような物質または材料の中で最も注目すべきものは、天然に存在するまたは生物工学によって誘導された酵素、タンパク質およびペプチド、例えば、グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ、カルシトニン、エリトロポエチン、ヘモグロビン、インスリン、インターロイキンまたはソマトトロピン；天然に存在する非タンパク質性高分子、例えば、ヘパリン、ワクチン、並びに「裸の」デスオキシリボ核酸 (D N A) およびデスオキシリボ核酸構築物を含めたそのままのまたは免疫原性サブユニット

に由来するおよび／または、放線菌、バチルス菌、球菌、真菌、蠕虫、幼虫、ブリオン（prions）、原生動物、リケッチア菌、スピロヘータ菌、ウイルス、多細胞寄生生物および酵母を含めたそのままの若しくは弱毒化された生物またはそれらの免疫原性サブユニットに由来するワクチン成分；埃、ふけ、花粉、胞子等に対する免疫感作またはアレルギー反応の弱化に用いられる寛容化された抗原；並びに細胞、例えば、封入されていない場合に受容者生物に対して異物として認識され且つ望ましくない免疫学的攻撃を受けるかもしれない、損傷された、機能不全のまたは失われた組織および／または器官の代用物として役立つように内植された場合のヒトまたは他の種に由来する膵島細胞、肝細胞、インターロイキン-および他のイムノモジュレーター分泌細胞である。

更に、本発明は、フルオロウラシルなどの極めて刺激性の薬物を封入した後、このような薬物の毒性を低減させる、更には封入する、徐々に放出する、および多数の薬物（抗炎症薬、例えば、プレドニゾロンおよびインドメタシン；抗体、例えば、テトラサイクリン；または抗癌薬、例えば、テオフィリンで代表される）の均一な治療的濃度を持続するのに十分に遅い速度で放出するための手段を提供する。ブルーデキストランまたは木炭などの着色または不透明材料を封入するのに用いる場合、システムは、生物活性物質、例えば、光に対して不安定であるイヴェルメクチン（外部寄生生物撲滅薬）およびBtタンパク質（バチルス・トウリンギエンシス（*Bacillus thuringiensis*）幼虫撲滅性タンパク質）を光防護し且つこののような薬剤を徐々にかまたはトリガーバーストで放出するのに用いることができる。蛍光標識されたマイクロカプセルを製造し且つ用いて、封入された製剤をカラーコードし、識別し、そして検出および位置決定を助けることができる。

もう一つの態様により、本発明は、ロタウイルス粒子、並びに大部分のカプセル封入システムにおいて従来用いられた有機溶媒、高温および／または高圧によって典型的に不安定でありおよび／または変性される他のこのような薬剤のカプセル封入を提供する。本発明によってカプセル封入されるロタウイルスとしては、ロタウイルス感染に対して防御するワクチンとして特に有用であるロタウイルスの再構築株がある。

以下の説明から明らかになるように、本発明は、経口接種後に粘膜リンパ球集団（例えば、パイアーブ）中への抗原の貯入並びに経口または非経口接種後の組織中の抗原の持続を可能にする方法でのワクチンデリバリーを可能にする。

#### 図面の簡単な説明

添付の図1は、本発明のマイクロカプセル材料を製造する好ましい方法で用いられる装置の略側面図である。

#### 発明の詳細な説明

本発明のルイス塩壁で囲まれた水性コアのあるマイクロカプセルは、以下に記載のように製造される。カプセル封入システムは、陰イオンポリマーまたはそれらの水溶性塩の水溶液小滴と、低分子量陽イオンアミン反応体またはそれらの水溶性塩の水溶液との本質的に瞬間的な反応を用いて、小滴およびそれらの内容物のまわりに水不溶性皮膜を生成する。得られたマイクロカプセルのカプセル膜はイオン的に安定化された異方性ルイス塩膜である。

活性物質（例えば、薬物、ワクチンまたは有害生物駆除剤）の水性溶液または懸濁液および所望ならばアジュvant（光防護剤、着色剤）を、適当な多陰イオン高分子（すなわち、ポリマー）の（例えば、ナトリウム塩）水溶液中に溶解させるかまたは懸濁させる。次に、得られた溶液／懸濁液を、適当な水溶性アミンの（例えば、塩酸塩）水溶液中に小滴として分散させる。ポリマー小滴およびアミン溶液の明白な界面において塩交換反応が起こり、（アミンとポリマーとの間で生成される）極めて可溶性に乏しい塩が生成され、それが沈降して、活性成分が捕捉されている幾分球状のビーズまたはカプセルを生成する。包まれた活性成分を含む得られたマイクロカプセル懸濁液を集めること。

本発明によつ種々の活性物質をマイクロカプセルに封入することができるが、本発明は、主として免疫原性物質、特に、ロタウイルスのマイクロカプセル封入に関する以下に記載されるであろう。例えば、一つの実施態様により、本発明は、予防的免疫感作物質、すなわち、ワクチンとして有用な免疫原性物質の供給および／または免疫療法を可能にする。

本明細書中において用いられる「免疫原性組成物」という用語は、免疫原性ペプチドおよび／またはタンパク質を含む混合物を含めた免疫原性ペプチドおよび

タンパク質；自然のままの不活性な、弱毒化したおよび感染性のウイルス粒子；自然のままの死滅した、弱毒化したおよび感染性の原核生物；任意の生活環段階を含めた自然のままの死滅した、弱毒化したおよび感染性の原生動物；並びに自然のままの死滅した、弱毒化したおよび感染性の多細胞病原体を包含する。若干の実施態様において、エンベロープおよび無エンベロープウイルスによって代表されるウイルス株を用いて、マイクロカプセル封入ワクチンを提供することができる。

免疫原性ペプチドおよびタンパク質としては、免疫応答が望まれる抗原上で示されたエピトープと同一のまたは実質的に類似したエピトープを少なくとも含むペプチドおよびタンパク質がある。若干の好ましい実施態様において、免疫原性ペプチドおよびタンパク質は、免疫応答が望まれる病原体または細胞からの天然に存在するペプチドおよびタンパク質と同一である。タンパク質は、病原体、例えば、ウイルス、原核生物、原生動物病原体および多細胞寄生生物に由来しうる。更に、他の免疫標的、例えば、腫瘍および自己免疫疾患に関係したタンパク質もまた提供されうる。タンパク質は、天然源から精製されるかまたは組換えDNA技術を用いて生産される。好ましい実施態様において、免疫原性ペプチドおよびタンパク質は、病原体タンパク質、例えば、ウイルスコートタンパク質、原核生物外膜タンパク質または、病原体中和免疫応答が引き起こされうる他の抗原性タンパク質である。このようなマイクロカプセル封入ペプチドおよびタンパク質は、マイクロカプセル封入サブユニットワクチンである。

本明細書中で用いられる「実質的に類似したエピトープ」という用語は、あるタンパク質のエピトープと同一ではないが、それにもかかわらず、そのタンパク質に対して交差反応する細胞性または体液性免疫応答を引き起こす構造を有するエピトープを指すことを意味する。

免疫原性ペプチドおよびタンパク質としては、このような成分を他の免疫原性ペプチドおよびタンパク質並びに／または非免疫原性成分と共に含む混合物がある。混合物は、他の成分を含む出発材料からの免疫原性ペプチドおよびタンパク質の部分精製によって得ることもできる。

ウイルスワクチンは周知であり、不活性なまたは「死滅した」ウイルス粒子；

組換え的挿入、欠失若しくは挿入などによってまたは選択的継代技術によって感染能力が中和されている弱毒化ウイルス粒子；免疫原性タンパク質をコードしている遺伝子を供給し且つ発現させるために他の種に対してまたは組換え体ベクターとして用いられる感染性ウイルスがある。若干の実施態様において、エンベロープおよび無エンベロープウイルスによって代表されるウイルス株を用いて、マイクロカプセル封入ワクチンを提供することができる。

同様に、原核生物ワクチンは周知であり、死滅した生物；感染能力が中和されている弱毒化生物；免疫原性タンパク質をコードしている遺伝子を供給し且つ発現させるための組換え体ベクターを含む感染性生物がある。

組換え体ベクターの場合、ベクター中に挿入された遺伝子によってコードされたタンパク質は免疫標的である。免疫標的の例としては、限定されないが、病原体タンパク質、例えば、ウイルス、原核生物、原生動物病原体および多細胞寄生生物からのタンパク質または腫瘍および自己免疫疾患に関係したタンパク質がある。

自然のままの死滅したまたは弱毒化された原生動物生物を用いる原生動物病原体に対するワクチンは、概して、ワクチン接種された生物が通常は宿主である生活段階にある生物を用いて、適切な免疫標的が示されることを確実にする。

免疫原性タンパク質の生産用ベクターの供給に加えて、マイクロカプセル封入ベクターはまた、非免疫原性タンパク質をコードする治療的遺伝子を該ベクターが運ぶ遺伝子療法用途において提供されることもありうると考えられる。そのようなベクターとしては、限定されないが、ウイルスベクター、例えば、組換えレトロウイルスおよび組換えアデノウイルスがある。

もう一つの実施態様により、本発明は、予防的免疫感作物質、すなわち、ロタウイルスワクチンとして供給するのに有用なマイクロカプセル封入口タウイルス工を提供する。

ロタウイルスワクチンは周知であり、ウシ W C 3 ( A T C C 受託番号 V R - 2 1 0 2 ) ; H C R 3 a ( 1 9 9 1 年 5 月 1 日に寄託された A T C C 受託番号 V R - 2 3 2 5 ) ; ヒト v p W 1 7 9 によって修飾されたウシ W C 3 ; ヒト W 1 7 8 - 8 によって修飾されたウシ W C 3 ; ヒト W 1 7 9 - 9 によって ( 1 9 8 7 年

11月25日に寄託されたATCC受託番号VR-2194およびVR-2196)またはSC2-9によって(1993年7月8日に寄託されたATCC受託番号VR-2417)修飾されたウシWC3;ヒトW179-9によって(1993年7月8日に寄託されたATCC受託番号VR-2415)およびW179-4によって(1992年6月19日に寄託されたATCC受託番号VR-2377)修飾されたウシWC3;ヒトv p 4 D S 1 によって修飾されたウシWC3(1993年7月8日に寄託されたATCC受託番号VR-2416);ヒトブリコート(B r i c o u t)B-9によって修飾されたウシWC3;ヒトv p 4 ブリコートAによって修飾されたウシWC3;ヒトW179-9によって修飾されたH C R 3 a (1991年5月1日に寄託されたATCC受託番号VR-2324);アカゲザルロタウイルスR R V;ヒトW a - 9によって修飾されたR R V;ヒトD S 1 - 9によって修飾されたR R V;ヒトP - 9によって修飾されたR R V;およびヒトS T 3 - 9によって修飾されたR R Vがある。

本発明によって有用なロタウイルス株としては、それぞれが本明細書中に援用される1987年1月13日発行の米国特許第4,636,385号明細書;1987年11月30日出願の米国特許出願第07/126,477号明細書;1990年7月26日出願の米国特許出願第07/588,884号明細書;1991年5月1日出願の米国特許出願第07/694,968号明細書;および1992年6月22日出願の米国特許出願第07/902,321号明細書に記載されたものがある。

免疫原性組成物の水性溶液または懸濁液を、適当な多陰イオン高分子(すなわち、ポリマー)の(例えば、ナトリウム塩)水溶液中に溶解させるかまたは懸濁させる。次に、得られた溶液/懸濁液を、適当な水溶性アミンの(例えば、塩酸塩)水溶液中に小滴として分散させる。ポリマー小滴およびアミン溶液の見掛けの界面において塩交換反応が起こり、(アミンとポリマーとの間で生成される)極めて可溶性に乏しい塩が生成され、それが沈降して、免疫原性組成物が捕捉されている幾分球状のビーズまたはカプセルを生成する。包まれた免疫原性組成物を含む得られたマイクロカプセル懸濁液を集め。

陰イオンポリマーおよび反応体アミンは互いに反応した時、可溶性に乏しい沈

降物を速やかに生成し、そして小滴を包み、その前に小滴中のポリマーが拡散しすぎて小滴の形状をかなり歪めたりまたは皮膜を生成するのに必要とされる濃度より低いポリマー性反応体濃度に低下したりしないものの群より選択される。したがって、高粘度のポリマー溶液を用いる必要はないが、アミンは、ポリマー小滴によって画成された偽相境界まで速やかに拡散し且つそこで反応することができる必要がある。ポリマー溶液の粘度は、2.5～10センチボアズ程度に低くてよい。

ポリマー溶液小滴（免疫原性組成物のポリマー溶液中溶液または懸濁液を含む）をアミン溶液中に分散させる好都合な手段は、ポリマー溶液のエーロゾルを、それを攪拌しながらアミン溶液上に／中に落下させることである。エーロゾルを生じるためのベルヌーイ（B e r n o u l i ）型ネプライザの使用は、（変動係数が約10～20%の）平均付近の粒度分布が比較的広い（ガウス）マイクロカプセルを生じる。より狭い粒度分布が望まれる場合、本明細書中に記載の音響によって振動される小滴発生器を用いて、（直径の変動係数が約5%の）極めて均一なマイクロカプセルを提供することができる。

多くの場合、酸に不安定な免疫原性組成物が経口投与される場合のように、マイクロカプセルを腸溶材料によって被覆して、それらを胃酸から保護するのが望ましいことがありうる。適当な腸溶コーティング材料としては、酢酸フタル酸セルロースおよびポリオキシエチレン架橋ポリメタクリル酸がある。小粒子、錠剤およびカプセル剤に腸溶コーティングを与える技法は、製薬産業技術分野において周知である。

全くの水溶液からマイクロカプセルを製造する場合に用いられる反応体は、多数の市販元から入手可能であるが、いずれも、フィッシャー・サイエンティフィック・カンパニー（F i s h e r S c i e n t i f i c C o m p a n y）、F . M . C . コーポレーション（C o r p o r a t i o n ）、ラガー・ケミカル・カンパニー（R u g e r C h e m i c a l C o m p a n y ）、シグマ・ケミカル・カンパニー（S i g m a C h e m i c a l C o m p a n y ）および／またはザ・アップジョン・カンパニー（T h e U p j o h n C o m p a n y ）から購入された。

封入材料の速やかな放出は、マイクロカプセルの水性懸濁液に対して水溶性塩を固体としてかまたは該塩溶液として加えることによって達成される。どちらの場合にも、用いられる塩は、皮膜生成反応の逆行と同様に、不溶性皮膜と反応して水溶性イオン生成物を生じることができなければならない。皮膜生成反応が可逆反応であるということは明らかである。可溶性小分子の遅い放出は、マイクロカプセル壁を介するそれらの徐々の拡散によって実現される。拡散速度は、拡散する種の大きさおよび可溶性並びにカプセル壁の厚みおよび密度に依る。したがって、望まれた時に速やかに放出させることに加えて、封入処理は、可溶性封入材料の徐放が調節されるように行うことができる。

封入用試薬として有用であることが分かった陰イオンポリマーすなわち高分子は、アルギン酸；フルオレセインイソチオシアネートまたはローダミンイソチオシアネートなどの発蛍光団に対して結合したアルギン酸；アラビン酸；硫酸セルロース；カルボキシメチルセルロース；カラゲナン；コンドロイチン硫酸；ヘパリン；ポリアクリル酸；ポリオキシエチレン架橋ポリアクリル酸（例えば、ローム・ファルマ（R o h m P h a r m a）製のユードラジット（E u d r a g i t）L-100<sup>®</sup>）；およびポリビニルカルボン酸（例えば、カルボポル（C a r b o p o l）934<sup>®</sup>）から成る反応性カルボン酸基または硫酸基を有する水溶性ポリマーの群より得られる。若干の好ましい実施態様において、陰イオンポリマーは、それぞれがナトリウム塩として与えられているアルギン酸（フィッシャー・サイエンティフィック・カンパニー、フェアローン、N J）、ポリアクリル酸（アルドリッヂ・ケミカル・カンパニー（A l d r i c h C h e m i c a l C o . ）、セント・ルイス、M O）、硫酸セルロース（アルドリッヂ・ケミカル・カンパニー、セント・ルイス、M O）、カルボマー（C a r b o m e r）米国薬局方（カルボポル934<sup>®</sup>、B . F . グッドリッヂ（G o o d r i c h）、クリーヴランド、O H）、カルボキシメチルセルロース米国薬局方（中程度の粘度、ラガー・ケミカル・カンパニー・インコーポレーテッド、アービントン、N J）、ヘパリン米国薬局方（ザ・アップジョン・カンパニー、カラマズー、M I）およびアラビン酸（本明細書中に援用されている米国特許第2,666,759号明細書に記載の方法にしたがって単離された）から成る群より選択される

。若

干の好ましい実施態様において、陰イオンポリマーは、アルギン酸ナトリウムとして与えられるアルギン酸である。

本発明にしたがってマイクロカプセルを製造する場合に有用な陽イオン反応体は、アルギニン、デシルアミン、ドデシルアミン、エチレンジアミン、ピペラジン、メチレンブルー、オクタデシルアミン、トリエチルアミン、トリエチルテトラミンおよびスペルミンを含むモノー、ジー、トリーおよびテトラアミノ化合物の群より得られる。概して、陰イオンポリマーは、アルカリ金属イオン（例えば、ナトリウム）を有するそれらの中性塩として用いられ、そして塩基性反応体はそれらの塩化物または酢酸塩の形で用いられることが好ましい。若干の好ましい実施態様において、アミンは塩酸塩として与えられる。若干の好ましい実施態様において、アミンは、それぞれが塩酸塩として与えられているアルギニン（シグマ・ケミカル・カンパニー、セント・ルイス、MO）、ピペラジン（シグマ・ケミカル・カンパニー、セント・ルイス、MO）、エチレンジアミン（アルドリッヂ・ケミカル・カンパニー、セント・ルイス、MO）、トリエチルアミン（アルドリッヂ・ケミカル・カンパニー、セント・ルイス、MO）、トリエチレンテトラアミン（アルドリッヂ・ケミカル・カンパニー、セント・ルイス、MO）、メチレンブルー（フィッシャー・サイエンティフィック・カンパニー、フェアローン、NJ）およびスペルミン、並びに酢酸塩として与えられているオクタデシルアミン（シグマ・ケミカル・カンパニー、セント・ルイス、MO）から成る群より選択される。若干の好ましい実施態様において、アミンは、スペルミン塩酸塩として与えられるスペルミンである。

これまでの試験に基いて、本発明によって封入することができる材料には、それぞれ以下、すなわち、ブルーデキストラン、木炭、フルオロウラシル、インドメタシン、ニコチンアミド、フェノールレッド、プレドニゾロン、テトラサイクリン、テオフィリン、バチルス・トウリンギエンシス (B t) 亜種イスラエレンシス (israelensis) の幼虫撲滅性タンパク質、並びにエンベロープおよび無エンベロープウイルスワクシニアによって代表されるウイルス株および

ロタウイルスがある。

捕捉される免疫原性組成物と一緒にマイクロカプセルを生成する前に、陰イオンポリマーおよびアミンを個々に試験して、免疫原性組成物の免疫原性に対するそれらの作用を確認する。

陰イオンポリマーおよびアミンの感染力および免疫原性に対する作用を確認するためには、当業者は、容易に入手可能な出発材料を用いて日常検定を行うことができる。例えば、ある選択されたペプチドまたはタンパク質が種々の濃度の評価される成分の存在下および不存在下で免疫応答を引き起こす能力を確認して、該成分が該分子の免疫原性に対して有する作用を確認することができる。同様に、ある選択された感染性物質が細胞または動物に感染する能力を、種々の濃度の評価される成分の存在下および不存在下において検査して、該成分が感染力に対して有する作用を確認することができる。ロタウイルスの場合、ロタウイルス原液を、陰イオンポリマーの水性ナトリウム塩若しくはアミンの水性塩または食塩水などの対照と混合することができる。ロタウイルス感染力に対する成分の作用は、標準的なplaue検定によって確認される。

若干の実施態様において、マイクロカプセル封入ワクチンは経口投与された場合に有効であることが好ましいので、免疫原性組成物を失活させない陰イオンポリマーおよびアミンを組合せて試験して、模造胃酸中での分解に耐えるマイクロカプセルを生成するそれらの能力を確認する。

陰イオンポリマーの水性ナトリウム塩、好ましくは1mIを、水性アミン塩酸塩（または酢酸塩）、好ましくは1mIに対して滴加して、界面沈降物を生成する能力を確認する。固形物を生じる組合せを用いて、マイクロカプセルを製造する。マイクロカプセルは、本明細書中に援用される米国特許第4,744,933号明細書においてアルギン酸カルシウムマイクロカプセルの製造について記載されたのと同様に、陰イオンポリマーのナトリウム塩を約5μmの大きさの小滴としてアミン塩水溶液中に分散させることによって生成される。マイクロカプセルの短期安定性は、水溶液中において室温で5日間の観察によって調べられる。室温で安定なマイクロカプセルは、模造胃酸（pH 1.2）によって37℃で2

時間処理される。

次に、免疫原性組成物を失活させない且つ安定なマイクロカプセルを提供する陰イオンポリマーおよびアミンの組合せを用いて、マイクロカプセル封入ワクチ

ンを生成する。最初に、免疫原性組成物を陰イオンポリマーと混合する。次に、ポリマー／ウイルス混合物を小滴としてアミン中に分散させる。

本発明によって封入することができるヒトおよび家畜用ワクチンおよびロタウイルス株の更に別の例を以下に挙げる。

1. ヒト用ワクチン

ジフテリアトキソイド

百日咳トキソイド

破傷風トキソイド

B型肝炎表面抗原

呼吸シンシナルウイルス

アデノウイルス

パラインフルエンザウイルス

カナレイポックス (Canarypox) 組換え体

A型肝炎ウイルス

インフルエンザウイルス、生または不活化

黄熱病ウイルス

生弱毒化ポリオウイルス

狂犬病ウイルス

不活化ポリオウイルス

コレラ

インフルエンザ菌 (Hemophilus influenza) B型

ペスト菌 (Yersinia pestis) (ブラーク)

髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)

チフス菌 (Salmonella typhi) (腸チフス)

麻疹

B C G

おたふくかぜ

肺炎連鎖球菌 ( *S t r e p t o c c o c u s p n e u m o n i a e* )

風疹

水痘

ロタウイルス

ヒト免疫不全ウイルス

単純ヘルペスウイルス

サイトメガロウイルス

## 2. 家畜用ワクチン

### ウシ

ウシの伝染性鼻気管炎

パラインフルエンザ 3型

ウシ下痢症ウイルス

ウシの呼吸シンシチアルウイルス

ロタウイルス

コロナウイルス

狂犬病

ヘモフィルス属 ( *H a e m o p h i l u s* ) ノバストレラ属 ( *P a s t e u r e l l a* ) 種

レプトスピラ属 ( *L e p t o s p i r a* )

クロストリジウム属 ( *C l o s t r i d i a* ) 種

破傷風トキソイド

### イヌ

イヌのジステンパー／麻疹

イヌの肝炎

パルボウイルス属 ( *P a r v o v i r u s* )

コロナウイルス

狂犬病

ボレリア・バーグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)

レプトスピラ属

ネコ

ネコの鼻気管炎ウイルス

ネコカリチウイルス

汎白血球減少症ウイルス

ネコの白血病ウイルス

ネコの伝染性腹膜炎ウイルス

狂犬病

ブタ

伝染性胃腸炎

ロタウイルス

パルボウイルス属

仮性狂犬病

パスツレラ属

丹毒

レプトスピラ属種

ヘモフィルス属種

ボルデテラ属 (*Bordetella*)

破傷風トキソイド

ウマ

ウマの脳脊髄炎

ウマインフルエンザ

ウマの鼻肺炎

破傷風トキソイド

狂犬病

ウシ W C 3

H C R 3 a

ヒト v p W 1 7 9 によって修飾されたウシ W C 3

ヒト W 1 7 8 - 8 によって修飾されたウシ W C 3

ヒト W 1 7 9 - 9 または S C 2 - 9 によって修飾されたウシ W C 3

ヒト W 1 7 9 - 9 および - 4 によって修飾されたウシ W C 3

ヒト v p 4 D S 1 によって修飾されたウシ W C 3

ヒトブリコート B - 9 によって修飾されたウシ W C 3

ヒト v p 4 ブリコート A によって修飾されたウシ W C 3

ヒト W 1 7 9 - 9 によって修飾された H C R 3 a

アカゲザルロタウイルス R R V

ヒト W a - 9 によって修飾された R R V

ヒト D S 1 - 9 によって修飾された R R V

ヒト P - 9 によって修飾された R R V

ヒト S T 3 - 9 によって修飾された R R V

V V U K v p 7 と同定されたワクシニアウイルス株と、W C 3 および R R V と同定された二つのロタウイルス株の 2 種類のウイルスはうまく捕捉され、持続された後、本発明のマイクロカプセルから放出された。これら 2 種類のウイルスは、エンベロープおよび無エンベロープの二つの主要なウイルスの種類である。無エンベロープウイルス、例えば、ロタウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルスは、乾燥剤、洗剤および表面洗浄剤に対して、エンベロープウイルスよりもはるかに感受性が少ない。その結果、エンベロープ以外の無エンベロープウイルスは、下水中および周囲表面上で十分に生存している。エンベロープウイルスは、それらの表面脂質二重層のために無エンベロープウイルスほど活発ではなく、しかも上記に挙げられた薬剤との接触によって分解されやすい。ワクシニアウイルスは、免疫原性ペプチドおよびタンパク質をコードしている D N A が比較的容易に挿入されうる組換え体ベクターとしてのその使用のために、封入候補として選択された。ロタウイルス株は、ロタウイルスがヒトおよび他の幼児において重症

な、そして時々致死的な下痢を引き起こすことが知られているので試みに選択された。

本発明によるマイクロカプセルは、選択可能な中央値粒度での極めて狭い粒度分布のマイクロカプセルの製造を可能にする本明細書中に記載の装置によって製造することができる。これは、腸管与リンパ組織（その部分をしばしばバイア一班と称する）または呼吸器系の気管支管与リンパ組織を介して注入するためのま

たは摂取するためのマイクロカプセルを製造する場合に重要である。静脈内注入するためのマイクロカプセルは、必然的に、毛細血管床を通過するのに十分に小さい直径約5ミクロン未満でなければならない。吸入による投与用には、粒子は約5ミクロン未満の呼吸に適した粒度範囲になければならないし且つ深く肺胞部位に達するためには、粒子は2ミクロン未満の粒度範囲にあるのが好ましい。バイア一班の組織は、取り込む粒子の大きさが極めて特徴的であり、それらは10ミクロン、好ましくは約5ミクロン未満の大きさの粒子のみを取り込み且つ選択する。この装置は、5ミクロンの平均体積直径に近い範囲の0.25ミクロン未満の平均からの標準偏差によって、様々な大きさのマイクロカプセル集団を製造することができる。

本発明のワクチンは、例えば、眼内、鼻腔内、頬、口、吸入、直腸、皮下、筋肉内、動脈内、静脈内および腹腔内を含めた様々な経路によって投与することができる。本発明のワクチンは、非経口によって供給することができる。このようなワクチンの実施例は、カプセル封入されていないウイルスと比較して、実験マウスの免疫原性を数百倍～数千倍に増加させることができることが分かっている。システムは、精製ウイルスおよびウイルス組織培養懸濁液両方と共に十分に作用するので、面倒な且つ費用がかかるウイルス粒子の分離は必要とされない。

#### マイクロカプセル生成反応：

本発明により、2種類の反応の内の一つを用いて、水性媒質中でマイクロカプセルを生成することができる。これらは、酸-塩基反応および塩交換反応である

#### 酸-塩基反応：

いくつかの水溶性酸性ポリマーは、水溶液中において低分子量水溶性モノマーまたはオリゴーアミンと反応して、沈降しうる水溶性に乏しい塩を生成するであろう。この反応で沈降する水溶性酸性ポリマーの群としては、アラビン酸、硫酸セルロース、コンドロイチン硫酸、ヘパリンおよび上記酸性ポリマーの蛍光誘導体がある。この反応で水溶性に乏しい塩を生じるアミンの群としては、デシルアミン、ドデシルアミン、エチレンジアミン、ヘキサデシルアミン、メチレンブルー、オクタデシルアミン、ピペラジン、スペルミン、テトラデシルアミン、トリエチルアミンおよびトリエチレンテトラミンがある。

#### 塩交換反応：

上記の酸性ポリマーまたはある種の比較的水溶性に乏しい酸性ポリマーをそれらのそれぞれの中性塩（例えば、ナトリウムまたはアンモニウムイオンとの）溶液として用い且つ上記のアミンをそれらの水溶性塩（例えば、塩酸塩、酢酸塩）として溶解させる場合、水溶性に乏しい塩の生成を伴って同様の反応が起こる。この反応は、生成物の一つ（例えば、塩化ナトリウムまたは酢酸ナトリウム）が可溶性であり且つアミン-ポリマー塩が可溶性に乏しい塩交換反応と考えることができる。塩交換反応において水溶性塩として有用な酸性ポリマーの群としては、上記に挙げられたポリマー、そして更に、ナトリウム塩または水溶性塩の形の以下の酸性ポリマー、すなわち、アルギン酸および蛍光誘導体、例えば、フルオレセインイソチオシアネートおよびローダミンイソチオシアネート、アルギン酸および他の酸の誘導体、カルボキシメチルセルロース、ユードラジットL-100'（ポリオキシエチレン架橋ポリアクリル酸）、ポリアクリル酸、ポリビニルアクリル酸およびこれらのポリマーの蛍光誘導体がある。酸性ポリマーのこの多数の群は、塩交換反応においていずれもそれらのナトリウム塩または他の水溶性塩として、塩酸塩または酢酸塩の形のアミンの群のメンバの少なくとも一つと反応して、水溶性に乏しいアミン-ポリマー塩を生成する。しかしながら、可溶性に乏しい塩を生成する組合せ全部が本発明によるマイクロカプセルを生成するのではない。以下に記載の試験を参照し且つ以下の表1および2を比較されたい。

本明細書中で用いられる「陰イオンポリマー」、「ポリマー鎖」および「陰イオンポリマー溶液」という用語は、アミン-ポリマー塩を生成する場合に沈降するポリマーを指す意味である。同時に生成された交換反応の水溶性生成物（例えば、塩化ナトリウムまたは酢酸ナトリウム）に対する論及は、これらの水溶性生成物を指し示す特別な要求がなければ、本明細書中では特に論及しない。

したがって、本発明によってマイクロカプセル生成物質として用いることができる陰イオンポリマーの群は、カルボン酸酸性官能基を有する（アルギン酸、アラビン酸、カルボキシメチルセルロース、ユードラジットL-100、ポリアクリル酸およびポリビニルカルボン酸）、硫酸酸性基を有する（カラゲナン、硫酸セルロース、コンドロイチン硫酸、ヘパリン）、直鎖状または分岐状ポリアルキレン主鎖を有する（ポリアクリル酸、ポリビニルカルボン酸）、直鎖状炭水化物主鎖を有する（アルギン酸、硫酸セルロース、コンドロイチン硫酸、ヘパリン）並びに分岐状炭水化物主鎖を有する（アラビン酸）ポリマー性物質から成る。

本発明のマイクロカプセルにおいて、陰イオンポリマーは、マイクロカプセル壁の主要な構造成分を構成している。典型的に、ポリマーは、最も近隣の陰イオン基間に望ましい範囲の間隔を与えるように選択される。例えば、ポリマーのθ温度を越えるそれらの広げられた形において、陰イオン間距離は、ポリアクリル酸で2メチレン基の相当量に近く、アルギン酸、硫酸セルロース、コンドロイチン硫酸およびヘパリンで6、カルボキシメチルセルロースで10、そして高度に分岐状のアラビン酸で20～30メチレン基の相当量に近い。これは、種々の多孔度を有するカプセル壁を選択的に生成することを可能にする。T. J. スピーカー (Speaker) およびL. レスコ (Lesko)、米国特許第3,959,457号明細書、微粒状材料および該材料の製造法、1976年5月25日、第5節第6～20行を参照されたい。

本発明において用いられる陰イオンポリマーはいずれも、10kDを越える十分な平均分子量を有するので、それらは多価であり且つ広範囲の化学量論でアミンと反応することができる。実際に、陰イオンポリマー反復単位に対するアミンの化学量論の好ましい範囲は約0.2～約0.6であることが分かった。言い換

えると、ポリマー上の各10個の陰イオン基と組合せてポリマーの塩を生成するのに約2~6個のアミン分子が利用可能である。更に、いくつかのアミンは多価でもあるので、理論上、反応性種は複雑な網状構造を生成することがあり、そこにおいてアミンは陰イオンポリマー鎖を架橋するのに役立つ。陰イオンポリマーおよびアミンの溶液を一緒に攪拌した場合にはほとんど瞬間に生成する沈降物は、非晶質、凝集性、接着性、そしてしばしば糸状になりがちである。しかしながら、陰イオンポリマーおよびアミンの全組合せが、可溶性に乏しいアミン-ポリマー塩を生成するのではない。以下の表1に、これまでに試験された反応性種の二つの群を記載し、そしてこれらの組合せが反応した場合、出願人が沈降物の生成に成功した組合せを示す。陰イオンポリマーおよびアミンは、アミンおよびポリマー反復単位の近似当量（括弧内に示された）の増加順に挙げられている。

表1  
不溶性塩を生成するアミン/ポリマー組合せ

陰イオンポリマー	
p-アクリル酸	(74)
p-ビニルカルボン酸	(86)
アルギン酸	(176)
ユードラジットL-100	(185)
硫酸セルロース	(260)
カルボキシメチルセルロース	(295)
ヘパリン	(480)
コンドロイチン硫酸	(480)
酢酸フタル酸セルロース	(563)
アラビン酸	(1000)
アミン	
エチレンジアミン (30)	++00+000+0
トリエチレンテトラミン (37)	++0+0+0+0
ビペラジン (43)	00+00000000
スペルミン (51)	+++-+-+++-+0
アルギニン (87)	0+000000+0
トリエチルアミン (95)	0+000000+0
デシルアミン (156)	+++-+-+++-++
ドデシルアミン (170)	+++-+-+++-++
テトラデシルアミン (184)	+++-+-+++-++
メチレンブルー (187)	0+-+0+000+0
ヘキサデシルアミン (198)	+++-+-+++-++
オクタデシルアミン (212)	+++-+-+++-++

プラス記号 (+) は、反応体が混合された場合の沈降物の生成を示し、零 (0) は、沈降物が生成しないことを示す。

陰イオンポリマーおよびアミンの組合せの大部分は反応して水溶性に乏しいアミンポリマー塩を生成するが、少なくともこれまでに試験された条件下において

この組合せの内の少数の組合せがマイクロカプセルを生成することができるらしい。したがって、水不溶性アミンポリマー塩を生成する単純な能力それ自体は、少なくともこれまでに試験された条件下において、マイクロカプセル壁生成成分を決定的に識別させるものではない。

ある選択されたアミン／ポリマー対がカプセルおよびマイクロカプセルを生成するかどうかを確認するためには、以下の手順が有用である。アミンおよびポリマーの別々の水溶液を、酸型のポリマー約1%w/vおよびほぼ化学量論的に等量のアミンを等容量の水中に含むように調製する。或いは、ポリマーおよびアミンがこのような程度まで可溶性でない場合、アミンの水溶性塩（例えば、塩酸塩

または酢酸塩）およびポリマーの水溶性塩（例えば、ナトリウムまたはアンモニウム）の別々の溶液を調製する。約5ミリリットル容量のアミン溶液に対して、20～25マイクロリットル容量のポリマー溶液を連続的に加え、ポリマー溶液は約1センチメートルの高さから1滴ずつ加えられる。二つの溶液を、一方をもう一方に加えながら目視によって観察する。ポリマー溶液の小滴がアミン溶液に溶け込んで系が均一になるかどうか、またはポリマー溶液小滴のまわりに薄膜が生成し、そしてそれらが物理的に別個の且つ機械的に分離した材料として保持されるかどうかに注目する。

加えられた小滴がこのような薄膜を生成し、しかもアミン溶液と混合されて均一溶液を生成することができると考えられる。この可能性を更に厳密に調べるために、一定範囲の濃度にわたって調製されたポリマー小滴およびアミン溶液を用いる実験を繰り返して、最適反応体濃度を確定する必要がある。

アミンかまたは酸型のポリマーが、上記の試験を実施するのに十分に可溶性ではない場合、それらの代わりに塩の形の反応体対を互いに用いてよい。

表2は、アミンポリマー塩がこれまでに試験された条件において安定なマイクロカプセルを有效地に生成したものを見せる。

表2

## 安定なマイクロカプセルを生成するアミン／ポリマー組合せ

	陰イオンポリマー	(当量)
	p-アクリル酸	(74)
	p-ビニルカルボン酸	(86)
	アルギン酸	(176)
	ユードラジットL-100	(185)
	硫酸セルロース	(260)
	カルボキシメチルセルロース	(295)
	ヘパリン	(480)
	コンドロイチン硫酸	(480)
	酢酸フルタル酸セルロース	(563)
	アラビン酸	(1000)
アミン		
エチレンジアミン	(30)	++00+000000
トリエチレンテトラミン	(37)	+++0+000000
ビペラジン	(43)	00+00000000
スペルミン	(51)	+++-+-+-+00
アルギニン	(87)	0+0000000000
トリエチルアミン	(95)	+0000000000
デシルアミン	(156)	+++-+-+-+0+
ドデシルアミン	(170)	+++-+-+-+0+
テトラデシルアミン	(184)	+++-+-+-+0+
メチレンブロー	(187)	0+-0+000000
ヘキサデシルアミン	(198)	+++-+-+-+0+
オクタデシルアミン	(212)	+++-+-+-+0+

プラス記号 (+) は、反応体が  
マイクロカプセルを生成するこ  
とを示し、0は、生成しないこ  
とを示す。

安定なマイクロカプセル形状を生成するアミンおよびポリマーの水溶液組合せの能力は、第一に、反応体が混合されて可溶性に乏しい塩を生成することができるよう、それらが水溶性であり且つ反対に荷電していることが必要である。重要なことに、溶液中の陰イオンポリマー鎖は、アミン分子（イオン）の拡散する能力と比較して速やかに拡散する必要はない。更に、陰イオンポリマー溶液の小滴は、ポリマー小滴が広範囲にわたって歪められたりまたは大量のアミン溶液と極めて速く混合された状態にならないようにアミン溶液中に導入されるのが好ましい。これらのいくつかの必要条件は比較的容易に満たされる。これらの必要条件の根拠は、以下に更に詳細に記載された処理の操作によって理解されうる。

マイクロカプセル製造法の開始時に、陰イオンポリマー水溶液およびアミン水溶液は機械的に（すなわち、物理的に）分離した相である。室温において、陰イ

オンポリマー溶液の水分子は、高い(0.9+)熱力学的活性係数を有し（水の寄与分を除く）、且つポリマー分子よりもはるかに速く拡散すると予想される。ポリマー鎖(10kD, 100, 000amuを越える分子量)はコロイド様の

大きさを有し、しかも他のコロイド粒子と同様に挙動すると予想されうる。特に、陰イオンポリマーのコロイド溶液は、微小領域の比較的高いコロイドポリマー濃度および他の領域のポリマーの空隙の発生によって構造的に不均一に向かうであろうと予想される。コロイドポリマーのこの挙動は、最近、イトーら(1994) Science 263: 66~68により、経時共焦点レーザー顕微鏡写真によって示された。顕微鏡写真は、不均一に向かうこのような傾向およ空隙構造を示している。イトーらは、この挙動を、本発明において用いられたようなイオンポリマー(例えば、ポリアクリル酸ナトリウム)によって論及している。対照的に、アミン反応体(分子量400未満)は陰イオンポリマー鎖よりも熱力学的にはるかに活性であり、ポリマー鎖よりもはるかに速く拡散し(水分子よりも遅いが)、そしてそれらの溶液中に均一に分布していると考えられる。

陰イオンポリマー溶液の小滴を多量のアミン溶液中に導入する場合、それまで分離していた水性相がほとんど瞬間に混合して、それまで分離していた水性成分の相境界が見分けられない单一連続水性相を生成すると予想される。一方、陰イオンポリマーの低い拡散係数(典型的に、10kDに近い質量範囲のコロイドポリマーに対して $7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{秒}$ 未満)は、ポリマー分子がそれらの最初の位置から移動するのを残りのポリマー溶液小滴に相対して制限し、そして水分子とほとんど同程度に速く移動する多数のアミン分子(イオン)がポリマーに接近して静電気的に引き付けられ、そしてポリマーの陰イオン基と塩を生成するための時間を与える。したがって、多数のアミン単位との反応中のポリマー分子の相対的不動性は、ポリマー鎖のほぼ最初の位置における且つ小滴の形状を保持するシェルの沈降を可能にする。

小滴のまわりのこのシェルの発生は、1%w/vカルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液の約20マイクロリットルのほぼ球状の小滴を、デシルアミン塩酸塩の約1%w/v水溶液に対して注意深く加えることによって肉眼で容易に観察することができる。僅か1秒以内に、加えられた小滴のまわりにかろうじて

見分けられる球状薄膜が生成し、そして更に数秒間で、薄膜はますます厚くなり且つ更に乳白光を発するようになる。得られたマイクロカプセルは、パストール

ビペットによって回収するかまたは微細ネット上に集めることができる。このようなポリマー小滴が数センチメートルの高さからアミン溶液に対して送られる場合、小滴が歪められて回転楕円面または両凹ディスク様構造を生成し、それが同じく徐々に更に厚く且つ乳白光を発するシェルになるかもしれないということは極めてありうることであることに注目すべきである。アミン溶液を攪拌するかまたは急速に注いだ場合、加えられた小滴は、長球または糸状粒子を生成しがちであり、これらも同様に厚くなる。ポリマー溶液の小滴がより小さい場合、それらはより高い高さからアミン溶液上若しくは中に、または流動アミン溶液上／中に歪みを生じることなく分散することができる。実際には、直径約5～7ミクロンの小滴を、約1センチメートル／秒の線速度で流れるアミン溶液表面から5センチメートルの高さから加えてよく、それでもなおほとんど球状のマイクロカプセルを生じる。

ポリマー小滴を取り囲む薄膜が生成し且つ厚くなつて、マイクロカプセルができる方法を拡散過程のみによって記載するにはおそらく簡単過ぎるが、このような説明は、何が起こったのかなり正確な意味を伝えている。更に詳細な理解は、液一液界面を越えるイオン輸送の機序および力学の説明によって導かれうる。

I. ベンジャミン (Benjamin) (Science 261: 1558～1560, 1993年) は、時間平均的には水一ジクロロエタン界面は「分子的に鋭敏」であるが、短時間にわたってみると、熱変動が一方の液相と他方との毛管指状構造組合せの生成をもたらすことを示した。これらの毛管「指」は、相が大部分明確に分離していたとしても、一方の相からもう一方へのイオン輸送を可能にする。水性相のアミン含有部分のポリマー含有水性相中への同様の毛管侵入は、同様に、アミンポリマー塩のイオンが相互作用して、ポリマー小滴の保全性を大きく妨げることなく皮膜すなわち薄膜を生じる機序を与えるかもしれないと考えられる。

実際に、分離したマイクロカプセルを生成する反応体溶液の能力は、少なくとも一部分は、水性媒質中のポリマー鎖の相対的不動性およびアミン分子(イオ

ン)の相対的にはるかに大きい移動度、そしておそらくもう一部分は、アミンお

よりポリマー溶液間の見掛けの界面境界の短時間の熱による変動に依る。それは、高粘性溶液を必要としないが、むしろ、一方の種が遅く拡散する反応体であることを必要とする。マイクロカプセル生成機序についてのこの解釈は、他の完全に水性の封入系において示されたマイクロカプセル生成上の束縛とは全く相反する。

アミンポリマー塩沈降物の生成をもたらす反応は単純な塩交換であると理解されうるし、それゆえ、可逆反応の特性を有する。これがそのようにあることは、反応で生成された過剰の可溶性塩またはその濃厚溶液（例えば、塩化ナトリウムまたは酢酸ナトリウム）をマイクロカプセル懸濁液に対して加えることによって実証できる。マイクロカプセル集団を取り囲む水性媒質中の塩化ナトリウム濃度を約4%w/vまで上昇させることは、概して、それらの急速な溶解を引き起こす。しかしながら、塩化ナトリウムまたは別の、可溶性ポリマーおよびアミン塩を生成することができる電解質（例えば、4%w/v溶液を生成するリン酸ナトリウム）による処理は、極めて可溶性に乏しいアミン（例えば、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン）によって生成されたマイクロカプセルを完全に破壊しないかもしれないし、そしてこのようなマイクロカプセルを、例えば、分析目的のために破壊するためには、アミンの水性濃度を減少させることができる溶媒（例えば、シクロヘキサン）を加えることが有用である。

本発明のマイクロカプセルを生成するための現在のところ好ましい方法は、この目的のために開発された音響小滴生成装置を用いることである。

この装置は、陰イオンポリマー溶液の均一な微細小滴流を生じ、そしてそれを、陽イオン反応体溶液の絶えず再生される表面上におよびそれを介して導いて、新たにやって来る小滴が、先に与えられた小滴に衝突しないようにする。それによって、装置は、（1）マイクロカプセル集合体を生じる性質を減少させ、そして（2）極めて狭い粒度分布範囲を有する大集団のマイクロカプセルを生じる手段を与える。装置は、下方に流れる垂直流のポリマー溶液を、それが狭いオリフィスから出てくる直前に音波によって振動させることによって操作するので、液体流による音波伝達は、流れに一連の狭窄を起こした後、液体の表面張力の影響下において流れを均一な小滴の列に分散させる。小滴列は、連続流の陽イオン

反

応体を側面開口部（またはその位相同等物）から供給される細い円筒管中へ共軸方向的に導かれる。したがって、新たにやって来るポリマー小滴はそれぞれ、陽イオン反応体の新しい表面に出会い、そしてそれがそれ自体のカプセル壁を生成し始め且つ管の下方端から出る前に別の小滴と衝突し且つ合体する機会はごく僅かである。

マイクロカプセル製造用の音響装置の主要成分は、おそらく、2種類の液体流を一緒に導いてマイクロカプセルを生成させるようなその機能的配列順序によって最もよく記載されるかもしれない。この装置において、陰イオンポリマーおよびアミンの水溶液は別々の貯槽に貯蔵され、別々の輸送ラインを介してポンプ輸送される。アミン溶液は、主要な反応容器として役立つ改良されたT形管の縦棒部分へ供給され且つそこに入る。T形管は、Tの横棒の円筒軸が垂直方向に向けられるように固定されている。T形管の縦棒部分に入ったアミン溶液は、水平方向に数ミリメートル流れた後、T形管横棒の下半分から重力によって流出する。

（実際には、単純なT形管ではなく、むしろ臨床化学実験室においてしばしば「カクタス管」と称される種類の一つを用いることが有用であった。カクタス管は、小文字のhの概形を有し、本出願において、該管は、h形がさかさまになるよう配置されている。カクタス管の直線部分は約2cm長さであり且つ内径は約2mmである。）T形管から流れたアミン溶液は、貯槽へ戻され且つ再循環することができる。

ポリマー溶液は、（8ミクロンまたはより微細な保持力のある）膜フィルターを介し、続いてガラス毛管を介して、名目直径が20～25ミクロンに狭められているその末端にポンプ輸送され、そして微細な連続液体ジェットの形で出て来る。（狭められた毛管は、A. H. トーマス・カンパニー（Thomas Co.）などの実験用品供給施設から一般的に入手可能な種類の容量25、50または100マイクロリットルのガラス毛細管から容易に加工される。狭窄は、ポリマー溶液が1～2ミリリットル／分でポンプ輸送される場合にポリマー溶液ジェットが4～5メートル／秒の範囲の速度で出て来るようにするのが好ましいが、

当然ながら、これらの範囲外の流量および速度を用いてよい。)

毛管は、金属ブロック中の浅いV形溝中に合わせられ、そして（例えば、名目

エネルギー出力40ワットで操作される実験用超音波プローブの）音響変換器の軸方向に振動する先端に対して圧縮ばねによってしっかりと保持されているので、音響エネルギーは毛管壁を介して流动ポリマー溶液に対して伝達されて、ポリマー溶液ジェットを均一な大きさの小滴列に分散させる。

変換器－毛管－圧縮ブロック集成装置は、ポリマー溶液小滴の出て来る列が空气中を約3cm進み且つT形管横棒の上端へ軸方向に導かれて、T形管の側面（縦棒部分）から入ったアミン溶液上に衝突する。ポリマー溶液小滴はアミン溶液と反応してマイクロカプセルを生成し、それらはアミン溶液と一緒にT形管横棒の下端から流出する。

音波刺激の不存在下においても、上記のように毛管狭窄から出て来るポリマー溶液ジェットは、通常、液体流およびジェットが出てくる雰囲気の種々の自然の不安定性、いわゆる、液体ジェットのレイリー分裂の結果として、種々の大きさの小滴列に自然に分散すると考えられる。しかしながら、均一な大きさのマイクロカプセルを製造するためには、均一な大きさの小滴が生じることが望ましい。その理由のために、本発明の好ましい実施態様においては、液体流を周期的に音波によって乱すことによって均一な大きさの小滴を生じさせて、ジェットの軸に沿った一連の十分に強い圧縮（音）波を開始させる。一連の音波は、液体媒質を介して進み且つ液体自体よりもはるかに速くオリフィスから離れる。（ジェットは4～5メートル／秒の速度で出て来る。）ジェットの長さに沿った波列の伝播は、ジェット路に沿った連続ノードでの増加する構成的振幅の干渉パターンを発生する。オリフィスからある程度の距離において、表面波の振幅は液体の表面張力より大きくなり、そしてソニケーター周波数でポリマー溶液の小滴が生成する。この方法での均一な大きさの小滴列の生成は、P. J. ガレー（G a l l e y）およびG. M. ハイフチエ（H i e f t j e）、A p p l i e d S p e c t r o s c o p y 45: 1460～1463 (1992) によってある程度詳細に報告されている。

前述の方法および装置を例証するために、添付の図1を参照するが、そこには「h」形管状部材10が示されており、側脚入り口セグメント14および垂直交差セグメント12があり、アミン溶液16は、管セグメント14の上端に下向き

にポンプ輸送されるので、それは垂直セグメント12に入るよう、そしてセグメント14およびセグメント12の交差点において下方に流れる部分へとそれで、そこから管状セグメント12の下端に出ていく。セグメント14および12の交差点より上において、ポリマー溶液22は毛管部材18を介して導入され、該毛管の下端は、セグメント14および12の交差点より上の予め決定された距離（上記の典型的な説明においては約3センチメートル）におかれ、該交差点でアミン溶液流は下方にそれるので、ポリマー溶液の1滴ずつに処理された部分22は、下方に流れるアミン溶液とその地点で混合される。

上記のように、ポリマー溶液の1滴ずつ下方に流れる部分22の均一性を増加させるために、毛管18は、V形溝保持スロット（図面には示されなかった）によって金属ブロック24中に堅く保持され且つ断続的に音響によって刺激される。その目的のために、音響プローブ20は、毛細管18の下端近くで接触している。

単示時間当たりに生じる個々の小滴数は、ソニケーターの周波数から推定することができる。大抵の場合、周波数20KHzのソニケーターを用いた。生成される小滴数の推定値は、連続の小滴が互いに衝突し且つ合体するかまたは互いに付着して凝集したマイクロカプセルを生成することがある場合のために僅かに誤りがあるかもしれない。実際には、1%よりはるかに少ない小滴が、融合したまたは合体した形として存在している。全ての小滴が別個に生成されると仮定すると、個々の小滴の大きさは、ポリマー流量の情報から計算することができる。名目陰イオンポリマー流量1ミリリットル／分において、個々の小滴の体積は0.05マイクロリットル（立方ミリメートル）であり、球状小滴直径4.57ミクロンに相当する。1ミリリットル／分に近い流量および20KHzの音響周波数で生成されたマイクロカプセルの直径は、体積直径分粒（クールター（Coulter）理論）から推定される約5ミクロンである。

或いは、本質的にどんな大きさのポリマー溶液小滴も、陽イオン反応体溶液中に（例えば、噴霧によってまたはピベットから1滴ずつ与えることによって）導入してマイクロカプセルを生成することができる。多数の用途において、生成されたマイクロカプセルは極めて均一な大きさを有することが望ましく、したがつて、この均一性を誘導するいくつかの手段、例えば、上記の音響法が好ましい。

このような用途としては、しばしばバイアーバー斑と称される腸のリンパ組織への供給がある。バイアーバー斑のM細胞は、約10ミクロンより大きい粒子を優先的に拒絶するが、約10ミクロン未満の粒度範囲の粒子を取り込み且つそれらを他のリンパ組織へと運ぶ。

概して、本発明のマイクロカプセルは、0.1～2,000ミクロンの大きさであってよい。一般的な経口投与に有用な好ましい粒度範囲は500～1,000ミクロンである。若干の実施態様において、その範囲は100～200ミクロンである。他の実施態様において、例えば、腸のリンパ組織中のバイアーバー斑への供給のための物質の投与において、特に好ましい粒度範囲は1～10ミクロンである。

一部分は製造用流体が除去される程度に、そして一部分はコア溶質の性状に応じて、水性コアマイクロカプセルは、易流動性懸濁液として、粘着性の流動性濃厚物として、ペーストとして、脆いフレークとして、または更に処理してリオケーキとして集めることができる。凍結乾燥は、極めて水溶性のコア材料を用いて安定なマイクロカプセルを提供するのに特に望ましい。

いったん封入されたら、ロタウイルスなどのコア材料は周囲環境から保護されているが、半透過性マイクロカプセル壁を介してコア材料が活発に拡散しうる水性媒質中にカプセルを懸濁させることにより、マイクロカプセルから徐々に放出される。概して、壁生成用反応体の性状が一定に保持されている場合、極めて水溶性のコア材料は、水溶性に乏しいコア材料よりも速やかに放出されることが観察され、そして概して、低分子量の物質は、高分子量のものよりも速やかに放出される。若干の実施態様において、マイクロカプセルのリオケーキへの変換および水性媒質中の再懸濁が好ましい。

本発明によるワクチンは、少なくとも1種類のマイクロカプセルに封入された免疫原性組成物、例えば、ロタウイルスおよび薬学的に許容しうる担体または希釈剤を含む。場合により、ワクチンは、マイクロカプセルに封入されたおよびマイクロカプセルに封入されない免疫原性組成物および／またはアジュバントを含めた追加の成分を含んでいてよい。

本発明のワクチンは、一般的慣例にしたがって、緩衝剤、安定化剤、保存剤、可溶化剤および徐放を容易にするのに用いられる組成物を用いて配合することができる。概して、等張性のための添加剤としては、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトールおよびラクトースを挙げることができる。安定化剤としては、ゼラチンおよびアルブミンがある。アジュバントを用いてよい。アジュバントの例としては、R I B I (リビ・インコーポレーテッド (R i b i I n c . ) )、アルム (A l u m)、完全フロイント、不完全フロイント、ブロックコポリマー (シトルクス (C y t R x)、アトランタ G A)、Q S - 2 1 (ケンブリッジ・バイオテク・インコーポレーテッド (C a m b r i d g e B i o t e c h I n c . )、ケンブリッジ M A) および S A F - M (カイロン (C h i r o n)、エメリービル C A) を挙げることができる。ワクチンは溶液中で維持されてよいし、または多くの場合、特に組換え体ワクチンの場合、凍結乾燥されていてよい。凍結乾燥ワクチンは好都合に貯蔵され、投与前に滅菌溶液と混合されることができる。

マイクロカプセル封入免疫原組成物の投与量は免疫原組成物の性質、ワクチン接種される動物の種、年齢、重量及び一般的な物理的特徴並びにワクチンの組成に依存する。各パラメーターに関する最適用量の決定はルーチン方法によって行うことができる。一般に、本発明の幾つかの実施態様によると、ワクチンは免疫原組成物 0. 0 5 ~ 5 0 0 0  $\mu$  g / m l 無菌溶液、好ましくは 1 0 ~ 1 0 0 0  $\mu$  g / m l 無菌溶液を含む。約 0. 5 ~ 2 m l のタンパク質含有溶液を投与する。感染剤 (infectious agent) の投与量は所望の感染 (infectivity) レベル、ワクチン接種される動物の種、年齢、重量及び一般的な物理的特徴並びにワクチンの組

成に依存する。各パラメーターに関する最適用量の決定はルーチン方法によって行うことができる。

本発明によるワクチンは、例えば経口、鼻腔内、筋肉内、腹腔内又は皮下投与のような、適当な経路によって投与されることができる。幾つかの実施態様では、経口投与が好ましい。最初のワクチン接種後に、哺乳動物を再ワクチン接種によってブーストする(booster)ことができる。

種々な有効剤の投与に対する本発明のマイクロカプセルの有用性は下記実施例で実証される。

#### 実施例 1

##### プラセボマイクロカプセル

工程 1：便宜的に、最初にアニオンポリマーを水中 1% w/v 溶液として調製して、必要に応じて、希水酸化ナトリウム又は炭酸水素ナトリウムによって 7.0 ± 0.1 の pH に調節した。例えばアクリル酸と酢酸フタル酸セルロースのような、弱水溶性アニオンポリマーはそれらのナトリウム塩として溶液にした。新鮮なポリマー溶液を使用前に一晩水和させ、冷蔵庫の温度で貯蔵し、試験前又は使用前に室温に平衡させた。

工程 2：アミン溶液を水中 1% w/v 溶液として調製して、希塩酸（又は、幾つかの長鎖脂肪族第 1 級アミンの場合には、酢酸）を用いて、7.0 ± 0.1 の pH に調節した。例えばオクタデシルアミンのような、難溶性アミンは必要に応じて加熱して、それらの塩として溶液にした。

工程 3：アミンとポリマーの組合せが不溶性沈殿と有用なマイクロカプセルとを形成するか否かを、アニオンポリマー溶液の約 50 μl 小滴を小試験管内の約 5 ml 量のアミン溶液に加えることによって評価した。添加したアニオンポリマー溶液が不溶性沈殿を生じなかった場合には、この反応物対はもはや考察に値しないと見なされた。不溶性沈殿を生じた反応物の組合せは以下の工程 4 に進めた。

工程 4：上記工程 3 でさらに試験するように選択した各反応物対に関しては、5 ml 量のアニオンポリマーを等量の水で希釈し、10 cm の高さから、10 c

m ベトリ皿（蓋なし）に含まれる電磁気搅拌したアミン溶液 25 ml 上に噴霧した。噴霧はアニオンポリマー溶液を 18 ゲージ皮下注射針に通して 1 ml / 分の速度で供給し、空気流を 4 リットル / 分の速度で 12 ゲージ皮下注射針からポリマー供給針の先端を通過させることによって、実施した。

ポリマー溶液の再現可能な細い円錐状分散を形成するために、18 ゲージ針の先端を 75 度角度にやすりをかけ (filed)、12 ゲージ針の先端を 90 度にやすりをかけた。18 ゲージ針を水平に取り付け、長円形の開口を 12 ゲージ針の方向に上向きに配向させ、12 ゲージ針は垂直に配置した。空気流の先端 (12 ゲージ針) をポリマー供給針の先端の上方 2 mm の位置に、針の胴部をステンレス鋼クロスプレースにスポット溶接することによって固定して、ポリマー流が修正 18 ゲージ針から出るときに空気流がポリマー流を横切って流れるようにした。このネプライザを最適化する (例えば、ポリマー供給針先端の角度) ためには、一連の試行実験が必要であった。これらの試行には、水の代わりに、染料水溶液を用いて、ポリマー溶液を希釈して、着色ポリマーを滤紙の 12 cm 円上に噴霧した。

混合物がベトリ皿のガラス面に付着してチンドル効果を表示することができる分散粒子から構成されるかどうか及び／又は混合物が 100 x 倍率で顕微鏡検査したときに大ざっぱに偏球状粒子と見えるかどうかを知るために噴霧中と噴霧後に反応混合物を検査することによって、アミンポリマー組合せのマイクロカプセル形成における有用性を評価した。結果は表 2 に要約する。識別可能な偏球状粒子を生じたような反応物組合せはさらに、本明細書に述べるような多様な活性コ

ア物質のためのカプセル材料としての安定性と有用性とに関して評価した。

或いは、反応物対をそれらがマイクロカプセルを形成することができるか否かに関して空気駆動式 (air-driven) 噴霧デバイスによって試験するために、一定数のアミンポリマー組合せを上記音響装置を用いて評価した。

#### 実施例 2

アルギン酸ナトリウムの 0.5 % 水溶液 10 ml 量を約 5 μ 直径小滴として、スペルミン (塩酸塩として) 0.05 % 溶液 20 ml 量の穏やかに搅拌した表面

に約 10 分間にわたって分散させた。この混合物を遠心分離し (2000 重力分)、得られたマイクロカプセル状ペレットから上清を捨てた。ペレットの小部分を 100 x 倍率で検査したところ、無数の小さい偏球状粒子から成ることが見られた。

### 実施例 3

数日間水中に貯蔵した、実施例 1 と 2 に記載したようなプラセボマイクロカプセルの、人工胃液及び高い電解質濃度に対する安定性を検査するために、実施例 2 に述べたように製造したスペルミンアルギネートマイクロカプセルの懸濁液を水 20 ml 中に再懸濁させ、4 等分した。

1 部分は対照として留保した。

新鮮な懸濁液の数  $\mu$  l の第 2 アリコートを取り出し、残りは室温において栓をして保存した。次に続く 4 日間の各日に、この部分の残部を搅流 (vortexing) によって再懸濁させ、数  $\mu$  l を取り出した。この  $\mu$  l サンプルを迅速に顕微鏡スライドに供給し、検査し、100 x 倍率で写真撮影した。得られた顕微鏡写真を比較して、個々の粒子の外観が変化したか又は放置中に凝集したか否かを検査した。

第 3 アリコートを等量の人工胃液と混合して、直ちに検査し、37 °Cにおける 2 時間インキュベーション後に再び検査して、マイクロカプセルが胃の環境のような酸性環境に暴露されたときに溶解するかどうかを調べた。

固体塩化ナトリウムの 180 mg 部分を第 4 アリコートに加えて、塩化ナトリウムが溶解するまで、混合物を搅流した。塩化ナトリウムをえた部分を 100 x 倍率で目視検査して、加えた塩がマイクロカプセルの安定性に影響するかどうかを検査した。

### 結果 :

5 日間貯蔵した部分の検査は目視検査したときに又は顕微鏡写真を比較したときに検知されうる変化を示さなかった。酸で処理した部分は直ちにも 2 時間インキュベートしたときにも溶解しなかった、但し、約 4 x ノルマルオスモル (normal osmolar) の塩化ナトリウムによって処理した部分は全ての塩が溶解する前に清

澄化した。塩処理部分を顕微鏡検査したときにマイクロカプセルは見られなかつた。スペルミンアルギネートマイクロカプセルはヒト組織のノルマルオスモラリティ(normal osmolarity)よりも数倍高い電解質濃度に対しては不安定であると判定された。

#### 実施例 4

形成されるマイクロカプセルの収率に関してアミンとアニオンポリマーとの種々な組合せの化学量論の影響を調べることは重要であった。このために、図1に関連して本明細書で述べた音響装置によって得られるマイクロカプセルの一連のサンプルを、アニオンポリマーの連続希釈物と一定濃度のアミンとの反応によって下記のように調製した：

工程1：1% w/v アルギン酸ナトリウム水溶液を調製して、少なくとも24時間水和した後に、8μフィルターに通して濾過した。

工程2：0.05% w/v スペルミン（塩酸塩として）260ml量を調製した。

工程3：アルギン酸ナトリウム溶液10ml量を等量の水で希釈し、混合した後に、希釈物10mlをスペルミン溶液42ml量と一緒に用いて、上記アコースティックデバイスによってマイクロカプセルを製造した。残りのアルギン酸ナトリウム希釈物は工程4で用いるために保存した。

工程4：工程3からのアルギン酸ナトリウム希釈物をさらに10mlの水によって希釈し、混合後に、新たな希釈物の10mlをスペルミン溶液42ml量と一緒に用いて、上記アコースティックデバイスによってマイクロカプセルを製造した。残りのアルギン酸ナトリウム溶液は工程5で用いるために留保した。

工程5：上記工程4に述べたプロセスを引き続いて繰り返して、連続的に低濃度のアルギン酸ナトリウム溶液から一連のスペルミンアルギネートマイクロカプセルを製造した。

工程6：工程4と5において製造したスペルミンアルギネートマイクロカプセルの連続的バッチを搅流して、それらを完全に混合し、各懸濁液の見かけの吸光度(apparent absorbance)を550nm(反応物自体が測定可能な吸光度を有さ

ないことを予め調べたスペクトル領域)において直ちに測定した。各懸濁液の数μlのアリコートを顕微鏡スライドに供給し、100×倍率で写真撮影した。残りのサンプルは栓をして、室温において貯蔵し、50時間後に再検査して、写真撮影した。

## 結果 :

アルギネート濃度 %w/v	ミリモル		反応物* 比	見かけの吸光度 550 nm
	アルギネート* スペルミン			
0.50	0.028	0.056	1:2	0.14
0.25	0.014	0.056	1:4	0.19
0.125	0.007	0.056	1:8	0.26
0.063	0.0035	0.056	1:16	0.31
0.032	0.0018	0.056	1:32	0.20
0.016	0.009	0.056	1:64	0.06

\* アルギネートのミリモルはアルギネート反復単位に関して算出。

この吸光度測定値は、スペルミンアルギネートマイクロカプセルの最大密度がアルギネート反復単位1モル対スペルミン16モルの濃度比での反応物の使用に由来することを実証する。

## 実施例 5

反応混合物中の反応物の比が必ずしも、化学反応の生成物として結合した反応物の比と全く同じではないことは周知である。ある場合には、目的生成物の収率を改良する方向に反応を推し進めるために一方の反応物の過剰量が必要であるか又は望ましい。この実施例では、反応物の好ましい化学量論比は下記のように決定した:

上記実施例4の工程6に述べたように最高密度のマイクロカプセル収量を生じる反応物濃度を用いて、スペルミンアルギネートマイクロカプセルのバッチを調製して、生成物を遠心分離と新鮮水中での再懸濁とによって反復して回収した。洗浄したサンプルを風乾させ、燃焼分析をこのような研究を専門とする外部企業によって受けさせた。この企業にはサンプルを一定重量になるまで50℃未満の

温度（炭水化物誘導ポリマーの無水誘導体の形成を避けるため）において乾燥させるように指示した。

この燃焼分析は生成物が約25%スペルミン（又は各4アルギネート反復単位に対して約1スペルミン分子）の相当物を含むことを示した。したがって、マイクロカプセルを形成する反応は高いアミン対アニオン反応物比において最適化されるが、必ずしも全ての有効アミンがアミンポリマー塩を形成するために反応するとは限らない。この多重官能性(polyfunctional)アミンの各アミノ基が1つの酸性アルギネート反復単位と反応するように思われる。

#### 実施例 6

本明細書に開示するように製造したマイクロカプセルの望ましい性質は、マイクロカプセルが安定な個々の粒子として留まり、経時的に凝集する傾向を殆ど又は全く示さないことである。この性質を評価するために、異なる化学量論の一連のマイクロカプセル製剤(formulation)を製造後に連続的な間隔をおいて試験した。

上記実施例4で調製した製剤をテフロンライニング付きねじ込みキャップ管(teflon lined screw cap tube)に入れて、21~25°Cの温度範囲内で貯蔵した。6か月間にわたって約2か月間の間隔を置いて、サンプルを3回約30秒間攪流し、数μlのアリコートを100x倍率で検査した。

0.50%アルギネートと0.25%アルギネートとから製造された製剤は最初の2か月間隔の最後に大規模に凝集し、その後に全てが凝集した。0.125%アルギネートによって製造したサンプルは2か月目に単分散性であるが、4か月目及び6か月目に若干凝集した（それぞれ、10~20個の粒子の凝集物）。

試験した最低濃度(0.06%と0.03%)で製造した製剤は6か月後も単分散性に留まった。

#### 実施例 7

完全に水性のカプセル封入系に効果的に用いられるコア物質の範囲をある程度推定するために、2種類の水溶性薬物と、2種類の水溶性アジュvant物質と、2種類の水不溶性固体と、2種類のウイルスと、壁形成材料としてのスペルミン

アルギネート、スペルミンコンドロイチンスルフェート、エチレンジアミンセルローススルフェート又はオクタデシルアミンカルボキシメチルセルロースとを用いて、一連のカプセル封入を実施した。

#### 実施例 7 a

工程 1：テトラサイクリン塩基（Sigma Chemical Co.）の 1.5 mg サンプルを 0.06% アルギン酸ナトリウム水溶液 10 ml 中に溶解し、上記アコースティックデバイスを用いて、この溶液を塩酸スペルミンの 0.05% 水溶液 20 ml と一緒にして、テトラサイクリンを含むマイクロカプセルを形成した。

工程 2：マイクロカプセル懸濁液を遠心分離し（5,000 重力分）、上清をデカントした後に、ペレット化マイクロカプセルを 5 ml にするために充分な水中に再懸濁させることによって 5 回洗浄し、再ペレット化し（遠心分離によって）、デカントし、各場合にデカントされた液体を保存した。最終ペレットを 1.0 ml にするために充分な水中に再懸濁させ、これに 500 mg の固体塩化ナトリウムを加えた。この混合物を短時間攪流して、マイクロカプセルと添加塩との溶解を助成した。塩酸約 1  $\mu$  l 量を溶解マイクロカプセルと、保存されたデカント液体の各々とに加え、各溶液の吸光度を 268 nm において測定した。

3 回洗浄した後に得られた上清液はテトラサイクリンに特徴的な顕著な吸光度を示さなかつたが、268 nm における溶解マイクロカプセルの溶液の吸光度は、テトラサイクリンの初期量の 1/2 より多くが反復洗浄中にマイクロカプセル中に保存されることを実証した。

#### 実施例 7 b

工程 1：テトラサイクリン塩基の代わりにフルオロウラシル（Sigma Chemical Co.）を用いて、上記実施例 7 a の工程 1 に述べたようにカプセルに封入した。

工程 2：上記工程 1 で得られたマイクロカプセル懸濁液を、吸光度測定を 265 nm において実施した以外は、上記実施例 7 a の工程 2 に述べたように処理した。3 回洗浄した後に得られた上清液は有意なフルオロウラシル吸光度を示さない。

かったが、265 nmにおける溶解マイクロカプセルの溶液の吸光度は、フルオロウラシルの初期量の1/2より多くが反復洗浄中にマイクロカプセル中に保存されることを実証した。

#### 実施例 7 c

工程1：テトラサイクリン塩基の代わりにブルーデキストラン（Sigma Chemical Co.）（平均分子量2,000,000）の100mgサンプルを用いて、上記実施例7aの工程1に述べたようにカプセルに封入した。

工程2：上記工程1で得られたマイクロカプセル懸濁液を、吸光度測定を620 nmにおいて実施した以外は、上記実施例7aの工程2に述べたように処理した。

3回洗浄した後に得られた上清液はブルーデキストランの特徴的な、有意な吸光度を示さなかつたが、マイクロカプセルを溶解した後に620 nmにおける吸光度は、ブルーデキストランの初期量の1/2より多くが反復洗浄中にマイクロカプセル中に保存されることを実証した。

#### 実施例 7 d

工程1：プロムフェノールブルー（Fisher Scientific Co.）の100mgサンプルをナトリウムカルボキシメチルセルロース（中粘性、Ruggar Chemical Co.）の0.1%溶液25ml中に溶解し、得られた溶液を、微細な先端（0.1mm外径）に延伸された毛管に通して徐々に供給した（約1ml/分）。出現する小滴をpH 7.0の酢酸塩として可溶化されたオクタデシルアミン（Aldrich Chemical Co.）の緩慢に攪拌された0.1%水溶液中に約1cmの距離落下させた。

工程2：得られた約1.5mm直径マイクロカプセルをさらに1時間攪拌して、微細な網（netting）を用いて分離した。これらのマイクロカプセルを水2x100ml量で洗浄した。マイクロカプセルの約1/2を湿式貯蔵し、用いるまで冷凍した。マイクロカプセルの他の1/2を凍結乾燥させ、用いるまで乾式貯蔵した。

工程3：数ダースの凍結乾燥マイクロカプセルを数mlの水中で1時間再水和

させ、湿式貯蔵マイクロカプセルと同時に用いて、それらの pH 感受性を試験した。塩酸の希釀物を用いて 2、3 及び 4 の pH 値を有する溶液を形成した。これらの塩酸溶液に、若干の再水和マイクロカプセルと若干の湿式貯蔵マイクロカプセルとを一度に 1 個ずつ加えた。マイクロカプセルが周囲の媒質に、カプセル封入されたプロムフェノールブルー指示薬の pH 4 における青色から pH 3 における黄色までの予想変化と一致して変色することによって反応するかどうかを知るために、マイクロカプセルを観察した。

最初はしわのよった凍結乾燥マイクロカプセルは、水に加えると約 20 分間の期間にわたって偏球状形状を呈した。再水和マイクロカプセルと湿式貯蔵マイクロカプセルの両方が pH 4 媒質に加えた場合に青色に留まったが、pH 3 溶液に加えると数分間に黄色に変化した。カプセル封入したプロムフェノールブルーはマイクロカプセル内部の pH 値の指示薬として役立つが、マイクロカプセルから拡散しなかった。

#### 実施例 7 e

工程 1：微粉状木炭の 200 mg サンプルをナトリウムカルボキシメチルセルロースの 0.1 % 溶液 25 ml 中に溶解し、上記実施例 7 d の工程 1 に述べたようにカプセル封入した。

工程 2：得られた約 1.5 mm 直径マイクロカプセルをさらに 1 時間攪拌して、微細な網を用いて分離した。これらのマイクロカプセルを水 2 x 100 ml 量で洗浄し、室温において 2 か月間湿式貯蔵した。木炭含有マイクロカプセルを 2 週間毎に試験して、マイクロカプセルが完全に留まるか又はカプセル封入固体の幾らかが失われるかを調べた。

木炭含有マイクロカプセルは観察期間にわたって完全に留まり、この期間中にマイクロカプセルから固体コア物質が漏出する証拠は存在しなかった。

#### 実施例 7 f

工程 1：Bacillus thuringiensis 亜種 israelensis (Ecogen, Inc.) の菌株から単離した結晶質毒素の 10 mg サンプルをナトリウムセルローススルフェート (Aldrich Chemical

al Co.) の 1 % 溶液 25 ml 中に懸濁させ、上記実施例 7 e の工程 1 に述べたように、pH 7 の塩酸塩として可溶化されたエチレンジアミンの 1 % 水溶液 50 ml 中に滴加した。

工程 2：得られた結晶質毒素含有マイクロカプセルをさらに 1 時間攪拌し、微細な網を用いて分離した。これらのマイクロカプセルを水 2 x 100 ml 量で洗浄し、乾燥ドレインさせ (drained dry)、凍結乾燥させた。残留エチレンジアミン溶液と両方の洗浄液とを保存した。

工程 3：凍結乾燥マイクロカプセル 50 個を数 ml の水中で 1 時間再水和させ、再水和流体をドレインさせ、保存した。

工程 4：再水和マイクロカプセルを溶解し、これらに 1 モルのリン酸三ナトリウム 10 ml を加え、この混合物を 100 ml に希釈することによって、結晶質毒素を溶解した。

工程 5：残留反応流体と、両方の洗浄液 (wash) と、再水和流体と、溶解したマイクロカプセルとのタンパク質含量を、タンパク質 - 銅 (I) 複合体の吸光度を 4,4'-ジカルボキシ - 2,2'-ビキノリンによって 562 nmにおいて測定することによって算出した。マイクロカプセル中に結晶質毒素の初期量の 90 % を充分に越える量がマイクロカプセル中に保存され、マイクロカプセル形成反応中にごく小部分が失われたに過ぎない。

#### 実施例 7 g

ウイルスのカプセル封入のための本発明の有用性を実証するために、数セットの試薬と、しばしば異なるロットのウイルスとを用いて 3 種類の実験を実施したが、1 種類の実験の範囲内では各試行の目的と方法論とは同じであった。これら

の 3 種類の実験は (1) プラセボと、ウイルス含有マイクロカプセルとの調製、(2) マイクロカプセルからのウイルスの放出、及び (3) プラセボと、ウイルスマイクロビーズとの滴定であった。

2 種類のウイルス [5.4 x 10<sup>4</sup> p.f.u / ml (ブラーク形成単位 / ml) のタイターを有するロタウイルス菌株 WC-3 と、8.5 x 10<sup>4</sup> p.f.u / ml のタイターを有するワクシニアウイルス菌株 VVUKVp7] をカプセルに封入

した。

工程 1 : アニオンポリマー（例えば、アルギン酸ナトリウム）の 1 % w / v 中性水溶液の 5 m l サンプルを水 5 m l で希釈し、攪流によって混合する。希釈したサンプルをネプライザーに移し、上記実施例 1 の工程 4 で述べたように、希釈物を塩酸アミン（例えば、塩酸スペルミン）の中性 0.2 mM 水溶液の電磁気攪拌した 25 m l 量の約 40 cm<sup>2</sup> 表面に噴霧することによってマイクロカプセルを製造する。

工程 2 : ネプライザーを水 1 m l によってすすぎ洗いし、このすすぎ洗い液を上記工程 1 と同様にアミン溶液上に噴霧する。

工程 3 : 得られたマイクロカプセルを目盛り付き遠心管に移し、マイクロカプセルを遠心分離によって分離し、全液体量と沈降マイクロカプセル量とを測定する。

工程 4 : マイクロカプセルを使用の準備ができるまで冷凍貯蔵し、次に、攪流によって再分散させる。

工程 5 : 上記工程 1 における水 5 m l の代わりにウイルス懸濁液（例えば、ロタウイルス WC - 3）を用いて、上記工程 1 ~ 4 を繰り返す。

工程 6 a : マイクロカプセルを 1500 g × m（重力 × 分）においてペレット化し、デカントし、最初の量の 1 / 5 に等しい量の蒸留水中に再懸濁することによって洗浄する。プラセボカプセルのみに関しては、カプセル封入ウイルスと大体等しいと推定されるウイルス懸濁液のチャージ(charge)を工程 1 3 に詳述するように再懸濁カプセルに加える。長鎖アルキルアミン（例えば、酢酸塩としてのオクタデシルアミン）から製造したプラセボ又はウイルスマイクロカプセルを

迅速に破壊するために、等量のマイクロカプセル懸濁液を 300 m o s m o l (ミリオスモル) pH 7.0 水性リン酸塩緩衝液又は新鮮な 0.5 M 水性炭酸水素ナトリウムと混合して、等量のシクロヘキサンによって被覆する。この混合物を 1 分間置きに 5 分間短時間攪流する。次に、シクロヘキサン層を吸引する。ウイルスは、存在するならば、水相中に存在する。

工程 6 b : 多重官能性アミン（例えば、塩酸塩としてのスペルミン）から製造

した プラセボ 又は ウイルスマイクロカプセル を迅速に破壊するために、等量の 1 200 m o s m o l 塩化ナトリウムとマイクロカプセル懸濁液とを混合する、又は充分な固体の塩化ナトリウムをマイクロカプセル懸濁液に加えて、生成溶液に 4 % 塩化ナトリウムを含ませる。

工程 7：未加工サル腎臓の単層培養物を多重孔 (2.5 cm) 組織培養プレート中で、マイクロカプセルの破壊前の 72 時間から出発して調製する。

工程 8：約  $10^7$  ブラーク形成単位 / ml ( p f u / ml ) を含むストックウイルス懸濁液と、別に、マイクロカプセル洗浄液の上清と、破壊したマイクロカプセル懸濁液 (工程 6 a) との 6 種類の連続 10 倍希釈物を AVN 培地中に調製する。

AVN 培地は下記成分：

1. 塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸二水素ナトリウム、デキストロース、硝酸第 2 鉄、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、ビタミン、アミノ酸、炭酸水素ナトリウム、フェノールレッド指示薬を全て蒸留水中に溶解して含む、商業的に入手可能な Stocker 培地、

2. トリプトースホスフェートプロス、

3. グルタミン、及び

4. ベニシリンとストレプトマイシンとの混合物

を含む。

工程 9：細胞を生理的食塩水によって 2 回洗浄し、洗浄液を捨てる。

工程 10：連続した隣接孔に連続ウイルス希釈物の  $200 \mu l$  アリコートを接種し、37 度において 30 分間インキュベートする；

工程 11：細胞を最小塩とアガロース / トリプシンとの 1 : 1 混合物で被覆する。被覆細胞を 37 °C において 72 時間インキュベートする。

工程 12：細胞をアガロースと、中性レッドを含む 2 x Earl 平衡溶液との 1 : 1 混合物の  $1.5 \text{ ml} / \text{孔}$  で着色する。細胞を 37 °C において 24 時間インキュベートし、ブラーク / 孔を存在するならば計数する。細胞を 37 °C においてさらに 24 時間インキュベートし、存在する場合には、新たなブラーク / 孔を計

数し、オリジナルのウイルス懸濁液の p f u 数を算出する。

工程 1 3 : プラセボマイクロカプセル滴定に関しては、上記工程 7 を繰り返す。次に、約  $10^5$  p f u / ml のウイルス濃度を与えるために適切なストックウイルス懸濁液の既知量をプラセボマイクロカプセル懸濁液約 25 ml 量に加え、懸濁液を搅流によって混合する。

工程 1 4 : 懸濁液を遠心分離し、水相を実行可能な限り完全に吸引する。マイクロカプセルと吸引物の両方を保存する。

工程 1 5 : マイクロカプセルを 10 倍量の水中に再懸濁させ、再び遠心分離し、水相を吸引する。マイクロカプセルと吸引物の両方を保存する。

工程 1 6 : 工程 1 5 を繰り返す。

工程 1 7 : マイクロカプセルサンプルを二等分して、上記工程 6 a 又は 6 b で述べたように破壊する。

工程 1 8 : 上記工程 7 と、工程 9 ~ 1 2 とを繰り返し、工程 1 2 ではウイルス懸濁液の連続希釈物の代わりに連続吸引物、残留マイクロカプセル懸濁液及び破壊したマイクロカプセル調製物 (preparation) を用いる。

工程 1 9 : ウィルス含有マイクロカプセルを滴定するために、工程 1 3 ~ 1 9 を繰り返し、プラセボマイクロカプセル懸濁液の代わりにウイルスマイクロカプセル懸濁液を用いる。

対照、ウイルスマイクロカプセル及びプラセボ（試薬ブランク）マイクロカプセル滴定の工程の上記順序は下記のように要約することができる。ウイルス学では、滴定は細胞培養物中のウイルスブラークの計数である。

<u>工程の説明</u>	工程数		
	対照	プラセボ	ウイルス
	培養物	u-caps	u-caps
<u>マイクロカプセル製造</u>			
ポリマー混合、マイクロカプセル			
製造	—	1	5
糸のすすぎ洗い	—	2	2
遠心分離	—	3	3
マイクロカプセル貯蔵	—	4	4
マイクロカプセル破壊	—	6	6
<u>細胞培養物中のウイルスpla-ークの計数</u>			
サル細胞培養物の増殖	7	7	7
ストックウイルス培養物の希釀物製造	8	—	—
サル細胞培養物の洗浄	9	—	—
サル細胞へのストックウイルス培養物			
添加	10	—	—
細胞の洗浄とインキュベート	11	—	—
細胞培養物中のウイルスpla-ーク			
計数	12	—	—
<u>試薬ブランクとしてのプラセボマイクロカプセルの使用</u>			
プラセボへのストックウイルス	—	13	—
希釀物の添加			
遠心分離、相分離	—	14	—
再懸濁、遠心分離による			
マイクロカプセル洗浄	—	15	—
マイクロカプセル再洗浄	—	16	—
工程 6 におけるような			

プラセボマイクロカプセル破壊	—	17	—
<b>工程 18 は下記操作を含む</b>			
サル細胞培養物の洗浄	—	9	—
サル細胞への破壊マイクロカプセルと、 洗浄液との添加	—	10	—
細胞の洗浄とインキュベート	—	11	—
細胞培養物中のウイルスpla- ークの計数	—	12	—
<b><u>ウイルスマイクロカプセルのウイルス含量の推定</u></b>			
遠心分離、相分離	—	—	14
再懸濁、遠心分離による			
マイクロカプセル洗浄	—	—	15
マイクロカプセル再洗浄	—	—	16
<b>工程 6 におけるような</b>			
ウイルスマイクロカプセル破壊	—	—	17
<b>工程 18 は下記操作を含む</b>			
サル細胞培養物の洗浄	—	—	9
サル細胞への破壊マイクロカプセルと、 洗浄液との添加	—	—	10
細胞の洗浄とインキュベート	—	—	11
細胞培養物中のウイルスpla- ークの計数	—	—	12

プラセボ（スペルミンアルギネートマイクロカプセル）、ウイルス（スペルミンアルギネートマイクロカプセル中に封入されたWC-3）及び対照（カプセルに封入されないWC-3）の結果は下記表に要約する。

p f u / m l としての滴定データ

日付と マイクロビーズ種類	初期 懸濁液	上清（洗浄液）			マイクロカプセル	
		1	2	3	完全	破壊
92 12 03						
スペルミンアルギネット						
対照	5,400,000					
ウイルス	150,000	10,000	680	650	220	140,000
プラセボ	N.A.	30,000	8,700	660	450	180

対照、ウイルスマイクロカプセルおよびプラセボマイクロカプセルを用いた予備試験によれば、ウイルスの感染力および免疫原性がカプセル封入後でも維持されておりそしてウイルス充填の本質的部分が繰り返し洗浄後でもマイクロカプセルに維持されていることがわかった。ワクチニアウイルスの捕捉効果はロタウィルスのものより優れていた。両方とも感染力を維持していた。

## 実施例 8

マウス：8 -12 週齢 C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>ハプロタイプ) のマウスおよびCD2 (F1) マウス乳児(タコニック ブリーディング ラボラトリーズ(Taconic Breeding Laboratories)(ニューヨーク州、ジャーマンタウン(Germantown, NY))から購入)を、別々の隔離されたユニットに住まわせた。成人および雌親からの血清をELISAによりロタウィルス特異的抗体の存在について試験し、そしてこれらの実験では血清反応陰性の動物のみ使用した。

細胞：胎児ミドリザル-腎細胞 (MA-104) をオフィット、ビィ. エー. (Offit, P.A.) ら、1983 Infect. Immun. 42:293-300 に記載のように増殖した。

ウイルス：ウシロタウィルス菌株 WC3をクラーク、エッチエフ.(Clark, H.F.) ら、1986 Am. J. Dis. Child. 140:350-356 に記載のように我々の実験室で単離した。シミアン株 RRV(MMU 18006)をナサレー シュミット(Nathalie Schmidt) (カリフォルニア州、バークレーのウィラル アンド リッケティシアル ディジーズ ラボラトリー(Viral and Rickettsial Disease Laboratory, Berkeley, CA)から得た。これらの研究に使用するためのロタウィルスのブラーク精製ストックをMA-104細胞において調製した。ロタウィルスを増殖させ、精製し、分光分

析により定量化し、そしてオフィット、ピィ・エー・ら 1983 Infect. Immun. 42:293-300 およびオフィット、ピィ・エー・ら 1983 J. Virol. Methods 7:29-40に記載のようにブラーク分析により感染力を測定した。

マイクロカプセルを形成するための陰イオンポリマーおよびアミンの選択：これらのナトリウム塩として試験された陰イオンポリマーは、アルギン酸(ニュージャージー州フェアローンのフィッシャー サイエンティフィック社(Fisher Scientific Co., Fairlawn, N.J.))、ポリアクリル酸およびセルローススルフェート(ミズリー州セントルイスのアルドリッヂ ケミカル社(Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO.))、セルロースアセテートフタレート(ニューヨーク州、ロチェスターのイーストマンオーガニックケミカルズ、(Eastman Organic Chemicals, Rochester N.Y.))、カルボマー(Carbomer)USP(カルボポール(Carbopol) 934®, オハイオ州、クリーブランドのビィ・エフ・グッドリッヂ(B.F. Goodrich, Cleveland, OH.))、カルボキシメチルセルロース USP(中粘度、ニュージャージー州、イルビントンのルガーケミカル社(Ruger Chemical Co. Inc., Irvington, N.J.))、ヘパリン USP(ミシシッピ州、カラマゾーのジアップジョン社(The Upjohn Co., Kalamazoo, MI))および米国特許第2,666,759号の方法に従って単離されたアラビン酸である。マイクロカプセル壁の基本的構造成分を構成する陰イオンポリマーは、最も近い隣接するカルボキシレート基の間に一定のスペースを空けるように選択された。したがって、ポリマーの延長されたシテ形において、陰イオン相互の距離はポリアクリル酸では2個のメチレン基、アルギン酸およびセルローススルフェートでは6個、カルボキシメチルセルロースでは10個そして高度に枝分かれしたアラビン酸では20-30個の等価物と近似している。

アセテート(ミズリー州セントルイスのシグマケミカル社(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO.))として使用されるオクタデシルアミンを除いて、以下のアミンをこれらの塩酸塩として試験した：アルギニン、ドデシルアミン、およびピペラジン(ミズリー州セントルイスのシグマケミカル社)、エチレンジアミン、トリエチルアミンおよびトリエチレンテトラアミン(ミズリー州セントルイスのア

ルドリッヂ ケミカル社)、およびメチレンブルー(ニュージャージー州フェアローンのフィッシャー サイエンティフィック社)。塩基は、1分子当たり反応性第一、第二または第三アミノ基1-4個をもたらすように選択され、したがって多官能性アミンの場合、酸性ポリマー鎖の間およびその中で複数の塩橋の形成ができるようになる。

ロタウィルス感染力における様々な陰イオンポリマーおよびアミンの効果：ウシロタウィルス菌株 WC3( $5.0 \times 10^8$  pfu/ml)の細胞培養ストックを、0.9% NaCl、陰イオンポリマーの0.05N 水性ナトリウム塩、またはアミンの水性0.05M 塩のいずれかで1:50に希釈した(pH 7.0に調節)。混合物を、ブラーク分析により

ロタウィルス感染力におけるこれらの効果について滴定した。

水溶性ポリマーおよびアミンのマイクロカプセル形成能力および疑似胃酸における分解に耐える能力：ロタウィルスを不活化しないポリマーおよびアミンを、疑似胃酸中の分解に耐えるマイクロカプセルを形成する能力を測定するために、組合せて試験した。6個の水溶性陰イオンポリマーを7個の水性アミンと組合せて試験した(42個の組合せが可能)。最初に、陰イオンポリマーの水性ナトリウム塩1mlを、水性アミン塩酸塩(または酢酸塩)1mlへ滴加して界面沈殿を形成する能力を測定した。次いで、固体物質を生じる組合せを用いてマイクロカプセルを作った。マイクロカプセルは、アルギン酸カルシウムマイクロカプセルの製造について既に記載されたものと同様の方法(米国特許第4,744,933号)で、アミン塩の水溶液へほぼ5μmの大きさの小滴として、陰イオンポリマーのナトリウム塩を分散させることにより形成された。マイクロカプセルの短期安定性は、水溶液中で5日間室温で観察することにより試験された。室温で安定なマイクロカプセルは37°Cで2時間疑似胃酸(pH 1.2)で処理された。

安定なモノ-またはオリゴ-分散マイクロカプセルを提供する酸性ポリマーおよびアミンの組合せは、ポリマーの酸性繰り返し単位の当量に対するアミンの化学当量の比を32:1から1:32の範囲で変えることにより最適化された。マイクロカプセルの最大安定容量を提供する反応物の比を選択した。

マイクロカプセルのサイズは、光学顕微鏡により公知サイズのラテックスビー

ズ(カリフォルニア州パロ アルトのデューク サイエンティフィック社(Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA)と比較することにより測定された。

感染ウィルスを捕捉するためのアルギン酸ナトリウム-スペルミン塩酸塩マイクロカプセルの能力 :

WC3 の透明な細胞培養物ストック ( $6 \times 10^6$  pfu/ml) の 5ml アリコートを、 0.68 mM アルギン酸ナトリウム 5ml へ添加し、 0.55 mM スペルミン塩酸塩 20ml へ、 名目上 5  $\mu$ m の小滴として分散させた。ロタウィルスを含有するはずのマイクロカプセルを 600  $\times$ g で遠心分離し、 蒸留水で数回洗浄し、 8.0M 鹽酸ナトリウム (pH 7.0) で分解させた。分解 (ロタウィルス含有マイクロカプセルの) 後に得られる洗浄液および液体からの上澄み液をブラーク分析により感染ウィルスの存在について試験した。

ついて試験した。上記実験において放出されたウィルスがマイクロカプセルのマトリックス表面またはその中に存在するかどうかを測定するために、細胞培養物由来の WC3 の  $3 \times 10^7$  pfu (1 ml の容量) を、予め形成したウィルスを含まないスペルミン-アルギネットマイクロカプセル (プラセボビーズ) へ添加した。ウイルスは室温で 30 分間吸着した。ウィルスを添加したプラセボビーズを洗浄し、分解させそして上澄み液を上記したように感染ウィルスの存在について試験した。

コア充填の測定およびマイクロカプセル封入方法のコア充填効率 : マイクロカプセルに含まれるロタウィルス抗原の量を ELISA で測定した。簡単に言えば、 96 - 四部を有する、平底プレート (コースター) の個々の凹部に、 1.5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> および 3.5 mM NaHCO<sub>3</sub> 中に 1:1,000 に希釈したモルモット抗-WC3 高度免疫抗血清 100  $\mu$ l を一晩塗布した。凹部を、蒸留水に 1.73 M NaCl、0.03 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.13 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> および 0.025 % トウイーン 20 を含む緩衝液 (洗浄緩衝液) で 5 回洗浄した。BPS 中に 0.5% (v/v) ゼラチンおよび 0.05 % トウイーン 20 を含む緩衝液 (ブロック緩衝液) 200  $\mu$ l を、各凹部へ添加した。凹部を洗浄緩衝液で 3 回そして蒸留水で 2 回洗浄し、そして分解したロタウィルス含有マイクロカプセル調製物からの液体 100  $\mu$ l を各凹部へ添加し、室温で 1 時間インキュベーションした。凹部を洗浄緩衝液で 5 回洗浄し、そしてウサギ抗 WC3 高度免疫抗血清 100  $\mu$ l を各

凹部へ添加し、そして室温で1時間インキュベーションした。凹部を洗浄緩衝液で5回洗浄し、ホスファターゼ結合ヤギ抗-ウサギ IgG(ノースカロライナ州、ダルハムのオルガノンテクニカ(Organon Teknika, Durham, N.C.))の1:2,000希釈液(1%BAS中)100μlを各凹部へ添加し、室温で1時間インキュベーションした。洗浄緩衝液で5回洗浄後、1Mジエタノールアミン+0.1%(wt/wt)p-ニトロフェニルホスフェート100μlを各凹部へ添加し、プレートを37℃にて1時間140rpmで攪拌した。エチレンジアミンテトラ酢酸二ナトリウム50μlを各凹部へ添加し、比色の変化を、マイクロプレートリーダー(Microplate reader)2000(メリーランド州ウォーカーズビルのバイオホワイタッカー(BioWhittaker, Walkerville, MD))において、450nmで分析した。ロタウィルス抗原濃縮物を、公知濃度の精製ロタウィルスを用いて生じる標準曲線と比較することにより測定した。

ローダミン標識化マイクロカプセルを用いたマウスの接種および腸間附属性リンパ組織(GALT)におけるマイクロカプセルの分布：50 mM重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.5)中の濃度1mg/mlのローダミンイソチオシアネート(RITC, ミズリー州、セントルイスのシグマケミカル社)を等量で混合してアルギン酸ナトリウムと結合させた；反応は室温で2時間暗所で行った。次いでアルギン酸ナトリウム-RITCを消滅するまで蒸留水で透析し、スペルミン-アルギネートマイクロカプセルの形成に使用した。RITC標識化マイクロカプセルを、使用前に蒸留水で5回洗浄した。

8週齢の雌C57BL/6マウスに、20mgのローダミン標識化マイクロカプセルまたは20mgのローダミン標識化アルギン酸ナトリウムを、近位食道挿管法(proximal esophageal intubation)により経口接種した。接種後1, 4, 7, 14, 21および28日目に各グループから二匹のマウスを屠殺し、ペイエル班(Peyer's patches)(PP)、腸間膜リンパ節(MLN)および脾臓を摘出しそして手で裂いた。(脾臓赤血球はAKC培地(0.16M NH<sub>4</sub>Cl, 0.01M KHCO<sub>3</sub>, pH 7.2)で溶解させた)。すべての組織からの細胞を、5分間600×gにて遠心分離し、 RPMI 1640(メリーランド州ガイザースバーグのジブコ(GIBCO, Gaithersburg, MD))中で3回洗浄し、滅菌した非吸収

性綿のカラムに通過させた。各組織(100 l の容量)からの $1 \times 10^4$ 細胞をサイトスピン(Cytospin)2(ペンシルバニア州、ピッツバーグのシャンドン社(Shandon Inc., Pittsburgh, PA.))を用いて、1200 rpm の速度で5分間遠心分離して顕微鏡スライドへ移した。スライドを24時間風乾して、各細胞集団におけるローダミン標識化細胞の頻度を、520 nmの波長にて蛍光顕微鏡で測定した(ディアルックス(Dialux) 20、ドイツ国、リツ(Leitz, Germany))。

腹膜滲出物細胞によるローダミン標識化マイクロカプセルの吸収：腹膜滲出物細胞を、RPMI1640培地 5 mlで腹腔内接種後に成人C57BL/6マウスから得た。滲出物細胞をRPMI1640で2回洗浄し、10% FBS を含むRPMI1640 1 mlにつき $1 \times 10^5$ 細胞の濃度で再懸濁した。 $1 \times 10^4$ 個の細胞を、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて37°Cにて10分間ローダミン標識化スペルミン-アルギネートマイクロカプセルほぼ5 mgとともにインキュベーションした。細胞をPBSで2回洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート(イリノイ州、インディアナポリスのベーリングガーマンハイ

ム(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN.))と結合した抗-MAC 1(抗-CD11b)抗体のPBSにおいて1:100希釈液で室温で1時間染色した。細胞をPBS中で洗浄し、グリセロール-PBS(英国、ロンドンのシティフロール社(Citifluor, Citifluor Ltd., London, U.K.))に入れ、波長580 nm(フルオレセイン標識物の検出のため)および520 nm(ローダミン標識物の検出のため)で蛍光顕微鏡により検査した。

ロタウィルス含有マイクロカプセルまたは遊離ウィルスをマウスに接種後の間接免疫蛍光法によるGALTにおける細胞内ロタウィルス特異的たんぱく質の検出：8週齢のC57BL/6マウス4匹からなる二グループに、遊離またはマイクロカプセル封入したWC3ウィルスのいずれかを、マウス1匹当たりほぼ $1 \times 10^7$  pfuで経口接種した。各群からの一対のマウスを接種後1または4日してから屠殺し、PP、MLNおよび脾臓を摘出した。これらの組織からの細胞を集め、前記したように顕微鏡スライドへ遠心分離した。スライドをメタノール中で10分間固定し、風乾し、そしてPBS中で1:2,500に希釈したウサギポリクローン高免疫抗-WC3血清100 μlで1時間インキュベーションした。スライドをPBSで洗浄し、PBS中

で 1:100 に希釈したフルオレセイン結合ブタ抗 - ウサギ免疫グロブリン（カリфорニア州、カーペンテリアのダコ社 (Dako corporation, Carpenteria, CA)）100  $\mu$ l で 1 時間インキュベーションした。スライドを PBS で洗浄し、グリセロール - PBS で固定し、そして蛍光顕微鏡により検査した。

マイクロカプセル封入または遊離ウィルスを用いたマウスの経口または腸管外接種後のELISA によるロタウィルス特異的抗体の検出：2 - 4匹のマウスの群は、  
1) マイクロカプセル封入 WC3ロタウィルスまたは遊離 WC3のマウス一匹あたり  $5 \times 10^4$  または  $1 \times 10^4$  pfu で腹腔内接種したもの、2) マイクロカプセル封入 WC3または遊離 WC3 をマウス一匹あたり  $2.5 \times 10^4$  または  $6.25 \times 10^3$  pfu で経口接種したもの、  
3) マイクロカプセル封入 RRVロタウィルスまたは遊離 RRVをマウス一匹あたり  $1.25 \times 10^4$  または  $1.25 \times 10^4$  pfu で経口接種したもの、または 4) 疑似感染細胞培養物上澄み液の等量で経口接種したものであった。接種後 3 週間してから血清を眼窩後部毛管網状組織穿刺により得、以下のように ELISA によりロタウィルス結合 IgG の存在について試験した：96凹部を有する平底プレートの個々の凹部に、

いずれか PBS または容量 100  $\mu$ l の PBS 中で希釈した精製 WC3もしくは RRV200ng を塗布した。プレートを 4 °C で一晩貯蔵した。プレートを PBS で 4 回洗浄し、PBS 中で希釈した 1% BSA 200  $\mu$ l を各凹部へ添加して室温で 1 時間インキュベーションした。複数の凹部を PBS で 4 回洗浄し、抗血清の 2 倍の希釈物 (1:100 の希釈率で開始) 100  $\mu$ l を各凹部へ添加して室温で 1 時間インキュベーションした。凹部を PBS で 4 回洗浄し、そして 1% BSA において 1:2,000 に希釈されたホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ抗 - マウス IgG (アラバマ州、ビルミンガムのサザンバイオテクノロジー社 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL.)) を、各凹部へ添加して室温で 1 時間インキュベーションした。凹部を PBS で 4 回洗浄し、そして 0.04 % テトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ溶液 (メリーランド州、ガイザースバーグのキールケガードアンドペリー (Kierkegaard and Perry, Gaithersburg, MD.)) 100  $\mu$ l を添加し、5 分間インキュベーションした。85% 磷酸溶液 75  $\mu$ l を各凹部へ添加して、マイクロプレート ELISA リーダーにおいて 450nm の波長で比色の変化を測定した。血清は、ウィルス塗

布凹部におけるOD値がウィルス抗原で塗布していない凹部のOD値より >0.1大きい単位である場合、陽性と考えられた。

結果 - ロタウィルスにおけるウィルス水溶性陰イオンポリマーおよびアミンの効果：ロタウィルス感染力における効果が実質的ないことがアルギン酸、セルローススルフェート、セルロースアセテートフタレート、カルボポール934 ®、カル

ルボキシメチルセルロース、ポリアクリル酸、メチレンブルーおよびスペルミンについて見出された。感染力における2.5-10倍の低下がヘパリン、トリエチルアミン、トリエチレンテトラミン、アルギニン、エチレンジアミンおよびオクタデシルアミンについて記載された。感染力における30倍の低下がビペラジンで観察され、アラビジ酸については300倍の低下、およびドデシルアミンについては感染力の完全な除去が観察された。

水溶性ポリマーおよびアミンの疑似胃酸による分解に耐性のあるマイクロカプセル形成能力：ロタウィルス感染力における最低効果を示す6個の水溶性陰イオンポリマーおよび7個の水性アミンを、疑似胃酸による分解に耐性のある安定な、オリゴ-分散マイクロカプセルを形成する能力について組合せて試験した(42個

の組合せが可能)；ポリマーおよびアミンの42個の可能性のある組合せのうち14個は疑似胃酸において安定なマイクロカプセルを形成した。これらの組合せは、メチレンブルーとセルローススルフェートまたはセルロースアセテートフタレートのいずれか、スペルミンとアルギン酸またはセルローススルフェートのいずれか、トリエチレンテトラミンとアルギン酸またはセルローススルフェートのいずれか、またはオクタデシルアミンとアルギン酸、セルローススルフェート、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートフタレート、ポリアクリル酸、またはカルボポール934 ®のいずれかである。

アルギン酸ナトリウム-スペルミン塩酸塩マイクロカプセルの感染ウィルスを捕捉する能力：アルギン酸ナトリウムおよびスペルミン塩酸塩から作られたマイクロカプセルは、1) アルギン酸ナトリウムもスペルミン塩酸塩のいずれもロタ

ウィルスの感染力を低下させない、2) この組合せは単分散のマイクロカプセルを最も簡単に形成する、3) この組合せはカプセル材料の最大容量を提供するので、さらに研究するために選択された。感染ロタウィルスがマイクロカプセル内に含まれるかどうかを測定するために、WC3 ウィルスをスペルミン-アルギン酸塩マイクロカプセルに封入しそしてマイクロカプセルを数回洗浄した後で分解することにより感染ウィルスの存在について試験した。感染ウィルスは3回洗浄後に上澄み液には検出されなかったが、しかしマイクロカプセル分解時には明らかに放出された。さらに、感染ウィルスがマイクロカプセルの中または表面上に位置するかどうかを測定するために、ウィルスを、同様の方法で洗浄しそして分解した予め形成されたマイクロカプセルへ添加した。感染ウィルスは、ウィルスを添加した予め形成されたマイクロカプセルの分解後に放出されなかった。したがって、感染ロタウィルスはマトリックス内に位置し、スペルミン-アルギン酸塩マイクロカプセルの表面だけではなかった。

カプセル封入方法の効率、コア充填能力およびマイクロカプセルの物理的特性：三つの別々の実験において、感染ウィルスの初期量の1.0%、2.0%および6.3%がスペルミン-アルギン酸塩マイクロカプセルのマトリックス内に封入されていることが見出された。同様に、ウィルス抗原の初期量の2.0%-5.0%がマイクロカプセルに捕捉されていた。したがって、コア充填効率は両方の感染ウィルスおよび

ウィルス抗原についても同様であった。コア充填能力（すなわち、ビーズ材料の量で割ったウィルス抗原の量( $\text{wt}/\text{wt}$ )）は、ほぼ2.0%-3.0%であった。光学顕微鏡による公知サイズのラテックスビーズと比べて、マイクロカプセルの大多数はほぼ $2 \mu\text{m}$ の大きさであり、 $1-10 \mu\text{m}$ の範囲の大きさであった。

腹膜マクロファージによるローダミン標識化マイクロカプセルの吸収：ローダミン標識化スペルミン-アルギン酸塩マイクロカプセルは、その表面にMAC-1(CD11b)を有する腹膜滲出細胞においてのみ検出された。腹膜滲出細胞の調製物において、すべてのMAC-1を有する細胞のほぼ50%-60%がローダミン標識化マイクロカプセルを吸収した。

マウスの経口接種後のGALTにおけるローダミン標識化マイクロカプセルの分布

：成人 C57BL/6マウスに、各々ローダミン標識化スペルミン-アルギン酸塩マイクロカプセルほぼ20 mg を経口接種した。ローダミン標識化マイクロカプセルは、経口接種後少なくとも28日までに、PP, MLNおよび脾臓の細胞内で検出された。PPおよびMLNにおけるマイクロカプセルの最大量は接種後4日で検出され、脾臓では接種後14日で検出された。ローダミン標識化細胞は、ローダミン標識化アルギン酸ナトリウムを各々20 mg 経口接種した動物のPP、MLNまたは脾臓では検出されなかった。したがって、ローダミン標識化マイクロカプセルで接種後のGALTにおけるローダミン標識化細胞の存在は、腸管粘膜表面でのマイクロカプセルの分解およびローダミン標識化アルギン酸ナトリウムの吸収のためではなく、むしろビーズの活性貪食のためであった。

ロタウィルス含有マイクロカプセルまたは遊離ウィルスでマウス接種後の間接的イムノフルオレセインによるGALTにおけるロタウィルス特異的たんぱく質の検出：成人 C57BL/6マウスに、遊離またはマイクロカプセル封入ロタウィルス菌株WC3 のいずれかを、マウス一匹に付き $1.0 \times 10^7$  pfu の投与量で経口接種した。接種後1日および4日してから、動物を屠殺し、PP、MLN および脾臓の細胞を間接的イムノフルオレセインによりロタウィルス特異的たんぱく質の存在について試験した。マイクロカプセル封入ウィルス接種後1日および4日の両方とも、PP、MLN および脾臓から得られた $10^4$  個細胞につき、ロタウィルス特異的たんぱく質を含む細胞3-5 個が検出された。細胞含有ロタウィルス抗原は遊離ウィルスを接種

した動物からのリンパ組織には検出されなかった。

ロタウィルス免疫原性におけるマイクロカプセル封入の効果：感染ロタウィルスのカプセル封入がロタウィルスの免疫原性を強化するかどうかを測定するために、成人 C57BL/6マウスにマイクロカプセル封入または遊離RRV を腹腔内接種し、7日齢の CD2(F1) 乳児マウスに遊離もしくはマイクロカプセル封入 WC3 または RRV のいずれかの異なる投与量を経口接種した。3週間後に血清を得、ELISA によりロタウィルス特異的 IgG の存在について試験した。疑似感染した動物は一様にロタウィルス特異的 IgG 力値が <1:100 であった。動物は、力値が 1:400 (すなわち、疑似感染動物において検出されたもの以上に力値が少なくとも4倍上昇

)以上またはそれと同等である場合ロタウィルス特異的免疫反応を有すると考えられた。マイクロカプセル封入 WC3を  $5.0 \times 10^4$  または  $1.0 \times 10^4$  pfu で腸管外接種された動物4匹のうち3匹は検出可能なロタウィルス結合 IgG を発現したが、遊離 WC3 の等量を接種された動物4匹はいずれも発現しなかった。同様に、マウス1匹あたり  $1.25 \times 10^4$  pfu の投与量で RRV を経口接種されたマウス3匹のうち3匹ともロタウィルス特異的 IgG を発現したが、遊離ウィルスを同等量で接種したマウスではいなかった。マウス1匹あたり  $6.25 \times 10^5$  pfu の投与量でマイクロカプセル封入 WC3 を経口接種されたマウス4匹のうち3匹はロタウィルス特異的 IgG を発現したが、遊離ウィルスを同等量で接種したマウスは4匹中0であった。

この実施例は、感染ロタウィルスが水系システムを用いてマイクロカプセル封入されうることを示す。充填したフィルムマイクロカプセル封入方法の穏やかな性質は、有機溶媒の使用を必要とする方法よりもヒトおよび細胞免疫反応の誘起に必要なウィルスエピトープを保持することが期待できる。充填フィルムマイクロカプセルのさらに幾つかの特長は抗原伝達システムとしての使用に魅力的である。先ず、マイクロカプセルは安全で生物分解可能として一般的に考えられる材料から水性媒体中で作られる。アルギン酸ナトリウム、ケルプから抽出されるゲル化多糖類は、通常アイスクリーム、ソフトドリンク、およびサラダドレッシングに安定剤および増粘剤として使用される。スペルミン、スペルミジンの誘導体は、実際にはすべての哺乳動物細胞において見出されるポリアミンである。第二に、マイクロカプセルは胃酸による分解に抵抗するように作ることができる。第

三に、マイクロカプセルは抗原の効率的捕捉ができるような内部容量フラクションを有する。

インフルエンザたんぱく質含有PLCGマイクロカプセルに対しほぼ1%であることと比べ2.0-3.0%のロタウィルス抗原に対するコア充填能力が見出された。第四に、マイクロカプセル封入は室温またはそれ以下で行われる；カプセル封入されない感染ウィルスを直ちに除くことができる。最後に、マイクロカプセルは簡単に凍結乾燥することができ、安価に作られ、容易に市販の規模拡大に適合させることができ、そして滅菌調製することができる。

マウスへ投与する場合、より多数の蛍光スペルミン-アルギン酸塩マイクロカプセルが、経口接種してから4日目にPPおよびMLNで検出され、そして接種後14日目に脾臓で検出された。これらの見地は、PLCGマイクロカプセルを経口接種されたマウスにおいてすでに記載されているものとほぼ同じである(エルドリッジ、ジェイ・エッチ、(Eldridge, J.H)ら、1989 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 146:59-66; エルドリッジ、ジェイ・エッチ、ら、1990 J. Controlled Release 11: 205-214; エルドリッジ、ジェイ・エッチ、ら、1991 Mol. Immunol. 28: 287-294)。PLCGマイクロカプセルのPPへの吸収は、マイクロカプセルのサイズおよび疎水性に依存する。10 $\mu$ m以上の大径を有するPLCGマイクロカプセルはM細胞には吸収されずPPへ吸収された。直径5-10 $\mu$ mの範囲のPLCGマイクロカプセルはPPにおいて検出されるだけで、直径<5 $\mu$ mのものはPP、MLNおよび脾臓において検出された。スペルミン-アルギン酸塩マイクロカプセルの平均粒径(すなわち、2 $\mu$ m)は、PP、MLNおよび脾臓へのビーズの吸収と一致する。

蛍光スペルミン-アルギン酸塩マイクロカプセルは、たぶんPP内でマクロファージにより吸収される。その表面にMAC 1(CD11b)を有するこれらの腹膜滲出細胞においてのみローダミン標識化マイクロカプセルが検出されることは、これを支持する。同様に、マクロファージは、フルオレセイン標識化PLCGマイクロカプセルを含む細胞の表面においてMAC 1の存在により測定されるように、PLCGマイクロカプセルを飲み込む。PP内でマイクロカプセルを含むマクロファージがMLNおよび脾臓へ移行するかまたは遊離マイクロカプセルがリンパ系を介してMLNへ移行するか血液流れを介して脾臓(ここでこれらは局所マクロファージにより飲み込まれる)へ移行するかを測定することが残っている。マクロファージはPPにおいてすべての細胞の約5-9%である。したがって、PPにおけるすべての細胞の1.8%までにローダミン標識化スペルミン-アルギン酸塩マイクロカプセルが検出されることは、マイクロカプセルが利用可能なマクロファージの20-35%に吸収されていることを示す。

ロタウィルス特異的たんぱく質は、遊離ウィルスではなくマイクロカプセル封入ロタウィルスを経口接種されたマウスのGALTにおいて検出された。マイクロカ

ブセル封入口タウイルスを接種後のロタウイルス特異的たんぱく質の検出は、遊離ウィルス接種後に吸収されるより多量のウィルスの抗原表示細胞（ビーズを吸収）への伝達と一致する。しかしながら、これらの実験において接種された遊離ウィルスの量は、ヒト免疫反応を引き起こすのに適切であった。GALT抗原表示細胞（遊離ウィルスを接種された動物において）内でのロタウイルス特異的たんぱく質を検出することが不可能であることは、多分、抗原が異種宿主ウィルス感染後に検出されるのにあまりにも少ない量で生じるかまたは細胞の数があまりにも少ないという事実を反映する。ロタウイルス特異的抗原は、同種宿主（すなわちネズミ）ロタウイルスでマウス乳児に経口接種後にGALTにおいて検出された。

マイクロカプセル封入口タウイルスをマウスに経口または腸管外接種すると、ウィルス特異的抗体反応を引き起こす。これは遊離ウィルスの同じ量を接種後に起こされるよりも大きな規模であった。

上記に本発明の特定の実施態様が記載されおよび／または例示されているが、様々な他の実施態様も外部の開示から当業者には明らかである。したがって、本発明は記載および／または例示されている特定の実施態様に制限されるものではないが、しかし添付の請求の範囲から逸脱することのない限りかなりの変形および修正も可能である。

【 図 1 】

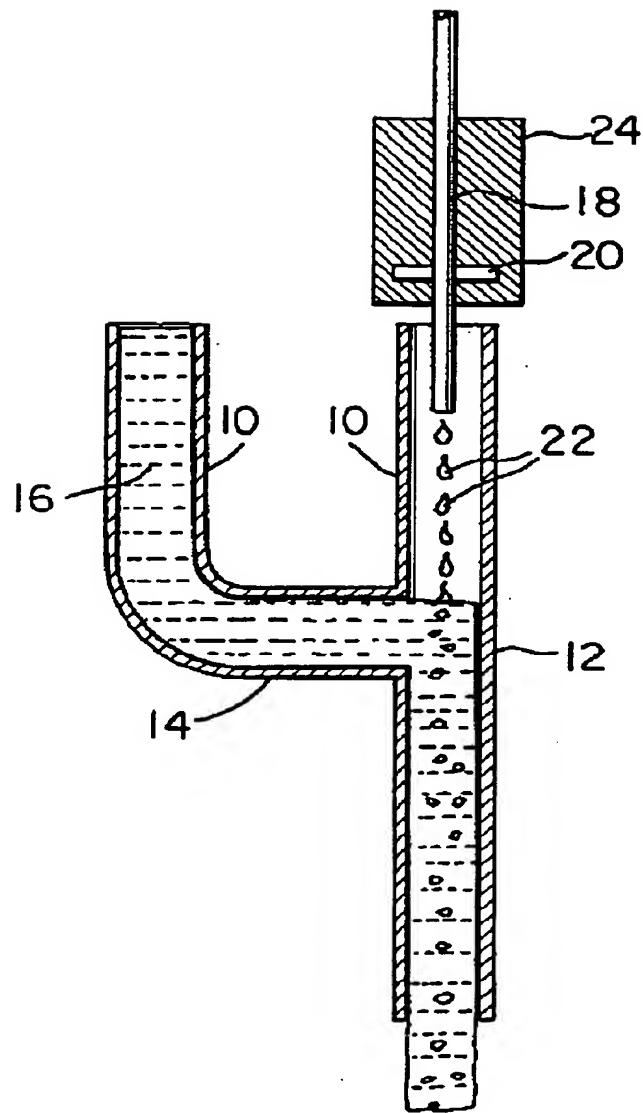


FIG. 1

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/04711

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : B01J 13/02; A61K 39/00, 9/14, 9/50; B28B 1/54  
 US CL : 264/4.1; 424/489, 499, 500, 501, 184.1; 425/5

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 264/4.1; 424/489, 499, 500, 501, 184.1; 425/5

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
**WORLD PATENT INDEX, CHEMICAL ABSTRACTS**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,352,883 (LIM) 05 OCTOBER 1982, see column 2 and claims.	1-29, 47-52
Y	US, A, 5,093,198 (SPEAKER ET AL.) 03 MARCH 1992, see abstract, columns 5-7 and claims.	1-29, 47-52
Y ---	Molecular Immunology, Volume 28, Number 3, issued 1991, Eldridge et al., "Biodegradable Microspheres as a Vaccine Delivery System", pages 287-294, see column 1, page 288.	1-29, 47-52 -----
A ---	Pharmaceutical Research, Volume 8, Number 3, issued 1991, Kwok et al., "Production of 5-15 µm Diameter Alginate-Polylysine Microcapsules by an Air-Atomization Technique", pages 341-344, see columns 1-2, page 341.	30-46

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Z"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 JULY 1995	21 AUG 1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer RICHARD LEE JONES Telephone No. (703) 308-1235

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/04711

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Journal of Infectious Diseases, Volume 158, Number 3, issued September 1988, Clark et al., "Protective Effect of WC3 Vaccine Against Rotavirus Diarrhea in Infants During a Predominantly Serotype 1 Rotavirus Season", pages 570-587, see column 1, page 228.	1-29, 47-52

フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
A 6 1 K 31/505		9454-4 C	A 6 1 K 31/505
31/52		9454-4 C	31/52
31/57		9454-4 C	31/57
31/65		9454-4 C	31/65
31/70		9551-4 C	31/70
35/76		8115-4 C	35/76
38/00		9455-4 C	39/00
38/16		9455-4 C	39/39
38/27		7433-4 C	47/40
38/28		9051-4 C	37/02
38/46		9051-4 C	37/54
39/00		9051-4 C	37/26
39/39		9051-4 C	37/36
47/40		9051-4 C	37/14

(31) 優先権主張番号 08/229, 520

(32) 優先日 1994年4月18日

(33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E,  
D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M  
C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G  
, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E, S N,  
T D, T G), A P (K E, M W, S D, S Z, U G),  
A M, A T, A U, B B, B G, B R, B Y, C A, C  
H, C N, C Z, D E, D K, E E, E S, F I, G B  
, G E, H U, I S, J P, K E, K G, K P, K R,  
K Z, L K, L R, L T, L U, L V, M D, M G, M  
N, M W, M X, N O, N Z, P L, P T, R O, R U  
, S D, S E, S G, S I, S K, T J, T M, T T,  
U A, U G, U S, U Z, V N

(72) 発明者 クラーク, フレッド・エイチ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州19130,  
フィラデルフィア, コリンシアン・ストリ  
ート 836

(72) 発明者 オフィット, ポール・エイ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州19146,  
フィラデルフィア, サウス・トゥエンティ  
フィフス・ストリート 410

(72) 発明者 モサー, シャーロット・エイ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州19020,  
ベンサレム, エサン・アレン・コート  
3240

(72) 発明者 スピーカー, タリー・ジェイ

アメリカ合衆国ペンシルバニア州19103,  
フィラデルフィア, チェリー・ストリート